

Modulation der Th1/Th2-Balance im Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus mit liposomal verkapselten Glukokortikoiden

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Eva-Maria Wendler
geboren am 20.02.1975 in Naumburg/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Rolf Bräuer
2. Prof. Dr. med. Raimund Kinne
3. Prof. Dr. med. Dr. phil. Jörg Kriegsmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.11.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Rheumatoide Arthritis	3
2.2. T-Zell-Subpopulationen und ihre Rolle in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	5
2.2.1. Th1-Zellen	7
2.2.2. Th17-Zellen	7
2.2.3. Th2-Zellen	8
2.2.4. regulatorische T-Zellen	8
2.2.5. Th-Zell-Subpopulationen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	9
2.3. Therapiekonzepte	10
2.4. Modelle der Arthritis	12
2.5. Glukokortikoide (GC)	15
2.6. Glukokortikoide (GC) und ihre Anwendung	16
2.7. Glukokortikoid-Nebenwirkungen	18
2.8. Lipotalon	19
3. Fragestellung	21
4. Material und Methoden	23
4.1. Material	23
4.1.1. Geräte	23
4.1.2. Verbrauchsmaterialien	24

4.1.3.	Chemikalien	24
4.1.4.	Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Puffer	26
4.1.5.	Verwendete Therapiesubstanzen	27
4.1.6.	Versuchstiere	28
4.2.	Methoden	28
4.2.1.	Immunisierung und Arthritisinduktion	28
4.2.2.	Beurteilung der Schwere der Arthritis	29
4.2.3.	Messung der zellulären Immunreaktivität in vivo	31
4.2.4.	Serumgewinnung	31
4.2.5.	Zellpräparation und Zellkulturen	32
4.2.6.	Zytokinbestimmung im ELISA	33
4.2.7.	Bestimmung der Immunglobuline (Ig) und Ig-Subklassen im Serum	34
4.2.8.	Statistische Auswertung	35
5.	Ergebnisse	36
5.1.	Einteilung der tierexperimentellen Studien	36
5.2.	Beurteilung der Arthritis	37
5.2.1.	Gelenkschwellung	38
5.2.2.	Gelenkentzündung und Gelenkdestruktion	42
5.2.3.	Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH)	46
5.2.4.	Antikörperbestimmung im Serum	49
5.2.5.	Immunglobuline im Serum	51
5.2.6.	Antigenspezifische Immunglobuline (mBSA-Ig)	55
5.2.7.	Zytokinbestimmung in Makrophagenüberständen	57
5.2.8.	Zytokinbestimmung in Milzzell-Überständen	64
5.2.9.	In-vitro-Untersuchungen	66
6.	Diskussion	69
6.1.	Klinische und histologische Veränderungen	72

6.1.1.	Therapeutische Wirksamkeit von Lipotalon in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis	72
6.1.2.	Reboundeffekt der klinischen und histologischen Arthritisaktivität nach Absetzen der Therapie	74
6.1.3.	Vergleich der Wirkung von liposomal gebundenem Dexamethason und freiem Dexamethason	74
6.2.	Veränderungen der humoralen Antwort	76
6.3.	Einfluss auf die Funktion von Makrophagen	76
6.3.1.	Reboundeffekt der inflammatorischen Aktivität von Makrophagen nach Absetzen einer Therapie mit Lipotalon	77
6.3.2.	Makrophagenaktivität im Verlauf der Arthritis unter Therapie mit Lipotalon	78
6.3.3.	Einfluss einer Therapie mit liposomal gebundenem Dexamethason auf die inflammatorische Makrophagenaktivität	79
6.3.4.	Einfluss von Lipotalon auf die Makrophagenaktivität in vitro	80
6.4.	Einfluss auf das Th1/Th2-Gleichgewicht	80
6.4.1.	Wirkung einer Therapie mit Lipotalon auf das Th1/Th2-Gewicht in vivo	82
6.4.2.	T-Zell-Aktivität im Verlauf der Arthritis unter Therapie mit Lipotalon	85
6.4.3.	Einfluss von liposomal gebundenem Dexamethason auf die Funktionen CD4+ T-Zellen in vitro	85
7.	Schlussfolgerung / Ausblick	87
8.	Literaturverzeichnis	89
9.	Danksagung	98
10.	Ehrenwörtliche Erklärung	99
11.	Lebenslauf	100

Abkürzungsverzeichnis

AA	Adjuvans-Arthritis
Abb.	Abbildung
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AP	Activator Protein
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans (engl.: complete Freund's adjuvant)
cGCR	zytosolischer Glukokortikoidrezeptor
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (engl.: collagen-induced arthritis)
ConA	Concanavalin A
DMARD	Basistherapeutika (engl.: disease-modifying antirheumatic drugs)
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DTH	verzögerte Überempfindlichkeit (engl.: delayed-type hypersensitivity)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
GC	Glukokortikoide
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	glucocorticoid responsive element
HLA	menschliches Leukozytenantigen (engl.: human leukocyte antigen)
HSP	Hitzeschockprotein (engl.: heat shock protein)
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.a.	intraartikulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
M ϕ	Makrophage
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
nGRE	negative glucocorticoid responsive element
NSAR	nichtsteroidalen Antirheumatika
PÄ	Prednisolonäquivalent
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylen-Glykol
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
RA	Rheumatoide Arthritis
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
s.c.	subkutan
SCID	severe combined immunodeficiency
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: standard error of the mean)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (engl.: transforming growth factor- β)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Th1/Th2	T-Helfer-Zell-Subpopulation 1/2
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
VCAM	vascular cell adhesion molecule

1. Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine häufig auftretende Autoimmunerkrankung, die mit einer Prävalenz von über 1% ein weltweites sozioökonomisches Problem darstellt. In den letzten Jahren wurden verschiedene neue antiinflammatorische Wirkprinzipien in der Therapie der RA angewendet. Trotzdem sind Glukokortikoide (GC) aufgrund des schnellen Wirkeintrittes und des hohen antiinflammatorischen Potentials unverzichtbarer Bestandteil einer zeitgemäßen Behandlung in der Rheumatologie. Ein gezielter Einsatz der Medikamente in effektiver Wirkdosis nach anerkannten Therapieschemata hat bereits in den letzten Jahren zu einer Reduktion der Nebenwirkungen geführt. Durch effektivere Darreichungsformen und neue galenische Ansätze muss versucht werden, diese Entwicklung weiter voranzutreiben. Ein vielversprechender Ansatz besteht in der liposomalen Verkapselung der GC. Durch diese galenische Darreichungsform ist ein gezielterer Wirkangriff, eine Reduktion der Nebenwirkungen sowie eine Verringerung der erforderlichen Dosis bei besserer Wirksamkeit zu erwarten.

Es soll daher in der vorliegenden Arbeit an der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) der Maus, einem Modell der Rheumatoiden Arthritis des Menschen, die Wirkungsmechanismen einer Therapie mit freien und liposomal verkapselten GC in vivo sowie auf zellulärer Ebene untersucht werden. Lipotalon, ein in Lipidmikrosphären gebundenes Dexamethason, wird im Modell der AIA eingesetzt und mit der Wirkung von freiem Dexamethason verglichen.

In verschiedenen Therapiestudien konnte gezeigt werden, dass eine Dosis von 0,5 mg/kg/d Lipotalon i.p. ab dem Tag der Arthritisinduktion verabreicht, klinisch, histologisch und hinsichtlich der T-Zell-Reaktivität (DTH) die wirksamste Konzentration darstellt. Ein Absetzen dieser Therapie am Tag 7 der Arthritis rief einen sowohl histologisch als auch anhand der T-Zell-Reaktivität im DTH-Test nachweisbaren Reboundeffekt hervor. Im Vergleich mit freiem Dexamethason war Lipotalon klinisch, histologisch sowie bezüglich der T-Zell-Reaktion (DTH) signifikant wirksamer.

Um die Wirksamkeit des liposomal verkapselten Dexamethason auf zellulärer Ebene zu analysieren, wurden Peritonealmakrophagen und Milzlymphozyten aus arthritischen, in vivo mit Lipotalon therapierten Tieren in unterschiedlichen Erkrankungsstadien gewonnen, in vitro stimuliert und das Zytokinspektrum im Kulturüberstand untersucht. Unter der Glukokortikoidtherapie beobachteten wir eine zunehmende Hemmung der TNF α -, IL-1- und IL-12-Produktion der Peritonealmakrophagen sowie in der chronischen Phase der Erkrankung eine Senkung der IFN γ - und IL-2-Sekretion der Milzlymphozyten. Während das antiinflammatorische und protektiv wirkende Th2-Zytokin IL-10 unter Lipotalonbehandlung

in Makrophagen nur wenig beeinflusst wird, produzieren Milzlymphozyten unter Therapie vermehrt IL-10. Nach Absetzen der Therapie am Tag 7 zeigt sich bezüglich des Zytokinverlaufs ein deutlicher Reboundeffekt, die Produktion von $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 lag nach Absetzen der Therapie deutlich über der Kontrolle. Lipotalon wirkt deutlich stärker hemmend auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-12) in Peritonealmakrophagen als freies Dexamethason. Im Rahmen weiterer In-vitro-Studien wurden Peritonealmakrophagen und Milzlymphozyten gewonnen, mit LPS bzw. ConA stimuliert und mit Lipotalon inkubiert. Dabei zeigte sich, dass Lipotalon in stimulierten Peritonealmakrophagen die Sekretion von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-12 verringert. In stimulierten Milzlymphozyten hemmt es die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ und steigert die IL-4-Sekretion.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Therapie mit Dexamethason in freier oder verkapselter Form eine Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine und eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance hin zu einer immunregulatorisch wirksamen Th2-Reaktion bewirkt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lipotalon sowohl klinisch als auch auf zellulärer Ebene eine stärkere Wirksamkeit als freies Dexamethason besitzt. Durch eine vermehrte Anreicherung selektiv im entzündlichen Gewebe und eine bessere Aufnahme des Liposteroids in Makrophagen durch Phagozytose wird ein sogenanntes „drug targeting“ erreicht, was zu einer stärkeren antientzündlichen Aktivität des Medikamentes führt. Darüber hinaus verbleiben liposomal verkapselte GC länger im entzündlichen Gewebe. Insgesamt ist damit eine niedrigere therapeutische Dosierung bei gleicher antientzündlicher Effektivität möglich. Hierdurch und infolge der Verkapselung der GC in Liposomen kann das Auftreten von Glukokortikoid-Nebenwirkungen reduziert werden. Sowohl in den Therapiestudien als auch in vitro wurde ein deutlicher Reboundeffekt nach Absetzen der GC-Therapie beobachtet. Ziel neuer Therapieregimes muss es sein, diesen zu minimieren. Hierfür eignen sich neben der schrittweisen Dosisreduktion am Therapieende vor allem Kombinationstherapien mit anderen antiinflammatorisch wirksamen Therapiesubstanzen. Die Fortführung und Weiterentwicklung des Therapiekonzeptes der GC, insbesondere im Hinblick auf die Minimierung der Nebenwirkungen bei verbesserter Wirksamkeit, ist auch zukünftig unverzichtbarer Bestandteil der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen.

2. Einleitung

2.1. Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die durch den entzündlichen Befall der Gelenkinnenhaut (Synovialis) zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führt. Fakultativ kann es zu extraartikulären Organmanifestationen kommen, so dass Muskulatur, Sehnen, Lunge, Herz und Auge ebenfalls befallen werden. Der schubweise progrediente Verlauf kann zur Gelenkdestruktion, somit zu massiven Funktionseinschränkungen und Invalidität führen. Weltweit ist ca. 1% der Bevölkerung erkrankt. Die Krankheit kann in jedem Lebensalter auftreten, jedoch der Häufigkeitsgipfel liegt im 4. Lebensjahrzehnt. Frauen sind 3-4 mal häufiger betroffen als Männer (Herold, 1997).

Als diagnostische Charakteristika dienen die 1987 überarbeiteten Kriterien des American College of Rheumatology. Diese umfassen sieben klinische Kriterien: die Morgensteifigkeit, das Auftreten der Arthritis an drei oder mehr Gelenkbereichen, ein Befall von Finger- und Handgelenken, ein symmetrisches Befallsmuster, die Rheumaknoten, den Nachweis von Rheumafaktoren und typische röntgenologische Veränderungen (Arnett et al., 1988; Herold, 1997).

Das Krankheitsbild ist histologisch primär durch unspezifische entzündliche Veränderungen in der Synovialis mit Infiltration neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen sowie Proliferation der Gefäße und der Synovialisdeckzellen gekennzeichnet. Im Verlauf der Erkrankung ändert sich das entzündliche Infiltrat und besteht im Wesentlichen aus Lymphozyten und Plasmazellen. Im Stroma der Synovialis finden mesenchymale proliferative Vorgänge statt, die einerseits zur Bildung der typischen rheumatoiden Granulome und zum anderen zur Bildung von Pannusgewebe führen, das zwischen die Gelenkflächen vorwächst und zur Destruktion des hyalinen Knorpels führt. Durch den jahrelang in Schüben verlaufenden Entzündungsprozess kommt es also zur Destruktion des Gelenkknorpels, der Gelenkflächen, des Knochens und so schließlich zur bindegewebigen und knöchernen Versteifung (Ankylose) des Gelenkes (Eder, 1990).

Die Ätiologie der RA ist nach wie vor unbekannt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei der RA um eine Autoimmunerkrankung, wenngleich ein auslösendes Antigen bisher nicht definiert werden konnte. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen Immunglobuline

(Rheumafaktoren), Antinukleäre Faktoren, Antikörper gegen TypII-Kollagen und Bestandteile des Zytoskeletts bei einer Vielzahl von Patienten weist auf eine Autoimmunerkrankung hin, wobei es keinen Beweis für die pathogenetische Bedeutung der als Autoantigene fungierenden Proteine gibt (Hein et al., 1995).

Aufgrund der Assoziationen der RA besonders zum HLA-DR4 und HLA-DR1 ist ein genetischer Zusammenhang anzunehmen. Insbesondere eine bestimmte Aminosäuresequenz im Bereich der beta-Kette des MHC-Klasse-II-Moleküls gilt für die Empfänglichkeit der Erkrankung als gesichert. Erstaunlicherweise ist diese Sequenz auch auf viralen Antigenen (zum Beispiel auf Oberflächenantigenen des Epstein-Barr-Virus) nachweisbar (Harris, 1990). Ein solches molekulares „Mimikry“ zwischen exogen und endogen Antigenen würde dann durch Kreuzreaktionen für die Auslösung von Autoimmunreaktionen verantwortlich sein. Durch ähnliche Mechanismen stehen neben Viren wie Epstein-Barr-Virus (EBV), Parvovirus B19, Retroviren auch bakterielle und humane „Heatshock“-Proteine als Krankheitsauslöser zur Diskussion (Blaschke et al., 2000; Inman, 1991; Ishii et al., 1999; Moreland and Koopman, 1991).

Die RA als chronisch-progressiv verlaufende Systemerkrankung mit vorwiegenden Befall kleiner Gelenke ist durch drei Phänomene gekennzeichnet: Entzündung, synoviale Hyperplasie und abnormer zellulärer und humoraler Immunantwort (Gay et al., 1993; Keyszer et al., 1994). Bei den pathogenetischen Mechanismen existiert immer noch eine Vielzahl von Unklarheiten, so dass einzelne Pathogeneseschritte weiterhin nur unvollkommen bekannt sind. In der ersten Phase könnte die Gewebsschädigung durch noch unbekannte infektiöse oder traumatische Faktoren angenommen werden, so dass es zur Auslösung inflammatorischer Reaktionen und immunologischer Mechanismen mit all ihren Effekten kommt. Als Folge der komplexen inflammatorischen und immunologischen Reaktionen führt die chronische Entzündung zur irreversiblen bzw. progredienten Gelenksschädigung (Pitzalis et al., 2001). Da die Entzündungsvorgänge in der Vergangenheit in den Vordergrund des ätiopathologischen Geschehens der RA gestellt wurden, werden heute vor allem antiinflammatorische Therapieprinzipien eingesetzt, mit den Nachteilen der ungenügenden Hemmung der Gelenkdestruktion und den hohen Nebenwirkungen (Schacht, 1993; Wollenhaupt and Zeidler, 1993).

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese der RA spielen die immunologischen Reaktionen im Bereich der Synovialmembran, die zu einer deutlichen Verdickung der synovialen Deckzellschicht führen. Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob die Hyperplasie hauptsächlich durch Einwanderung von Makrophagen oder durch lokale Proliferation der Fibroblasten bedingt ist (Geiler et al., 1997). In dem entzündlichen Milieu der Synovialmembran sind vor

allem proinflammatorische Zytokine vorhanden, produziert von Makrophagen (TNF α , IL-1, GM-CSF) und Fibroblasten (IL-6, FGF) (Field et al., 1991). Dominiert werden die Zytokine von TNF α (Chu et al., 1991) und IL-1 (Deleuran et al., 1992), die die synovialen Fibroblasten aktivieren und die Produktion von GM-CSF, IL-8 und Adhäsionmolekülen stimulieren.

2.2. T-Zell-Subpopulationen und ihre Rolle in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Brackertz et al. zeigte schon 1977 die T-Zell-Abhängigkeit der Antigen-induzierten Arthritis in der Nude-Maus sowie durch den Transfer der Arthritis durch Lymphozyten arthritischer Tiere. Die Reduktion der Krankheitsaktivität wird durch Vorbehandlung der Transferzellen mit Antiserum gegen den murinen T-Zell-Marker Thy-1 (Cdw90) erreicht. Eine Anreicherung der T-Zellen durch Abtrennung der B-Lymphozyten verstärkte das Krankheitsbild nach dem Transfer (Brackertz et al., 1977).

Die Rolle der CD8⁺ T-Zellen (Tc-Zellen) für die Entstehung und den Verlauf der Arthritis ist noch nicht gesichert. Hinweise für eine Downregulation der Immunreaktion in der AIA wurden beschrieben (Petrow et al., 1996b; Wutzler, 1998). Eine regulatorische Beteiligung der Tc-Zellen an der Pathogenese der CIA wird anhand von Untersuchungen in CD8-defizienten Mäusen vermutet (Tada et al., 1996).

T-Zellen können entsprechend ihrer unterschiedlichen Wirkungen in vivo und in vitro Subpopulationen unterteilt werden (Del Prete et al., 1995; Mosmann et al., 1986). Man unterscheidet Th1-Zellen, die die zelluläre Immunität sowie Th2-Zellen, die die humorale Immunität fördern, Th3 und Tr1-Zellen, die zelluläre und humorale Immunreaktionen steigern oder hemmen können. Diese unterschiedliche Funktionalität wird durch ein spezielles Zytokinmuster der einzelnen Subpopulationen vermittelt (Tabelle 1).

Verschiedene endogene und exogene Faktoren beeinflussen die Differenzierung der naiven Th-Vorläuferzellen zu den verschiedenen Subpopulationen der Th-Zellen (Th1, Th2, Th3 oder Tr1-Zellen).

Tabelle1: Zytokinprofil der T-Helferzellsubpopulationen (Frey et al., 2005; Langrish et al., 2005; Lubberts et al., 2005; Simon et al., 1994; van Roon et al., 2006)

Zytokine	Th1	T17	Th2	Th3	Tr1	nTreg
IFN- γ	+++		-			
TNF- β	+++		-			
IL-2	+++		+		+	
TNF- α	+++	+	+			
GM-CSF	++		++			
IL-3	++		+++			
IL-10	+		++		+++	+
IL-13	++		+++			
IL-4	-		+++			
IL-5	-		+++			
IL-6		+				
IL-17		+++				
TGF- β	-		-	+++		+

Die Differenzierung zu Th1-Zellen wird durch die Interleukine IL-12, IL-15, IL-18 und IFN γ aus aktivierten Makrophagen stimuliert, während IL-4 die Entwicklung von Th2-Zellen unterstützt. Durch diese gezielte Polarisierung der Th-Vorläuferzellen zu Th1- oder Th2-Zellen kann eine Modulation der Th1/Th2-Balance im Körper erfolgen und somit eine zelluläre (Th1) oder humorale (Th2) Immunantwort induziert werden. Eine Induktion der zellulären Th1-Antwort führt im Modell der Leishmaniasis zur erfolgreichen Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Erreger, jedoch die humorale Th2-Antwort zum tödlichen Ausgang der Infektionserkrankung (Menon and Bretscher, 1998; Sommer et al., 1998).

Für die Regulation der gezielten Differenzierung kommen in vivo neben den o.g. Zytokinen eine Vielzahl anderer Mechanismen in Frage. Zum einen besteht eine Regulation der Zytokine untereinander, zum anderen ist die Polarisierung häufig auch von der Konzentration der Interleukine abhängig. So konnten in vitro durch IL-4, einem Th2-Zytokin, in Abhängigkeit von dessen Serumkonzentration sowohl Th2- als auch Th1-Zellen polarisiert werden (Lingnau et al., 1998). Die differenzierten T-Zell-Subpopulationen können also durch ihre Zytokinsekretion eine Polarisierung weiterer naiver Th-Vorläuferzellen beeinflussen.

Durch exogen Faktoren ist eine Beeinflussung der Th-Zellen nach abgeschlossener Differenzierung nicht mehr möglich (Isomaki et al., 1999; Mocci and Coffman, 1997).

Durch die Untersuchung ihrer spezifischen Zytokinsekretion und die Bestimmung von Ig-Subklassen im Serum ist eine Unterscheidung der Th-Subpopulationen möglich. Der

Isotypwechsel zu IgG2a und IgG2b wird durch Th1-Zytokine, zu IgG1 und IgE durch Th2-Zytokine beeinflusst (Finkelman et al., 1990).

2.2.1. Th1-Zellen

Th1-Zellen sezernieren vor allem IL-2, IFN γ und TNF α/β und aktivieren die zelluläre Immunantwort. IFN γ und TNF β inhibieren die B-Zellreaktion und damit die humorale Immunität. IFN γ aktiviert Monozyten und Makrophagen, die durch eine erhöhte Expression von Fc-Rezeptoren verstärkt Immunglobuline binden können und ihrerseits IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 und TNF α sezernieren. Die Sekretion von IL-12 in Kombination mit IL-15 und IL-18 führt zu einer Förderung der Bildung von Th1-Zellen. B-Zellen werden durch Th1-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen der Subklassen IgG2a und IgG2b, opsonierenden und komplementbindenden zytotoxischen Antikörpern angeregt.

Insgesamt resultiert daraus eine Induktion der zellulären Immunität, d.h. der Immunabwehr v.a. intrazellulärer Erreger wie Viren, intrazellulären Bakterien oder Protozoen. Auf demselben Mechanismus basiert die Induktion der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ (DTH1). Die Th1-Zellen werden jedoch auch für die Entwicklung von Autoimmunphänomenen, wie im Falle der RA, verantwortlich gemacht.

2.2.2. Th17-Zellen

Als weitere proinflammatorische Zellpopulation wurden in letzter Zeit die IL-17-produzierenden Th17-Zellen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen die autoimmune Entzündungsreaktion in Tiermodellen der Multiplen Sklerose fördern können (Langrish et al., 2005; van Roon et al., 2006). Th17-Zellen kommen auch im arthritischen Gelenk in großen Mengen vor (Chabaud et al., 1999). In IL-17-defizienten Mäusen war dagegen die Auslösung einer Kollagen-induzierten Arthritis nicht möglich (Nakae et al., 2003).

Entscheidend für die Differenzierung von Th17-Zellen scheint das Vorhandensein von IL-23 zu sein. Es wurde gezeigt, dass eine Blockade von IL-17 durch einen monoklonalen Antikörper im Modell der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) eine Reduktion der Erkrankungsschwere zur Folge hatte (Langrish et al., 2005). Mit einem anti-IL-23-Antikörper konnte der Ausbruch der Erkrankung vollständig verhindert werden (Chen et al., 2006). Dies spricht für das Vorliegen weiterer Mechanismen, die neben IL-17 die proinflammatorische Aktivität von Th17-Zellen vermitteln können.

Diese Befunde belegen eine Schlüsselrolle der Th17-Zellen und des von ihnen produzierten IL-17 in der Pathogenese von entzündlichen Autoimmunerkrankungen.

2.2.3. Th2-Zellen

Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. IL-4 fördert die Produktion von Immunglobulinen, insbesondere der Isotypen IgG1 und IgE durch B-Zellen. IL-5 aktiviert Mastzellen und führt zu einer verstärkten Sekretion von IgA, das für die Abwehrfunktion der Schleimhäute eine besondere Bedeutung hat. IL-5 fördert außerdem die Proliferation von Eosinophilen. Th2-Zellen begünstigen somit die humorale Immunantwort, sind aber durch die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 auch für eine überschießende Proliferation und Aktivierung von Eosinophilen und Mastzellen im Rahmen allergischer Erkrankungen verantwortlich. Th2-Zellen bewirken die Entstehung der DTH2-Reaktion (Muller et al., 1994).

2.2.4. regulatorische T-Zellen

Seit einiger Zeit kennt man eine T-Zell-Subpopulation, deren wichtigste Funktion darin besteht, Immunreaktionen, die durch autoreaktive T-Zellen ausgelöst werden, zu limitieren. Man hat diese Zellpopulation als regulatorische T-Zellen bezeichnet.

Sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten und Menschen sind sogenannte natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) als wichtigste Träger dieser Funktion nachgewiesen worden. Dabei handelt es sich um CD4 und CD25 exprimierende Zellen, die außerdem durch die Expression des spezifischen Transskriptionsfaktors FoxP3 gekennzeichnet sind (Cao et al., 2006; Frey et al., 2005). CD4+CD25+ Zellen sind anerge, wenig proliferierende Zellen, die nur wenig Zytokine sezernieren. Sie verlassen den Thymus als „professionelle“ regulatorische T-Zellen, proliferieren in der Peripherie und erwerben einen Effektor/Memory-Phänotyp. Sowohl beim Menschen als auch im Maussystem bilden regulatorische T-Zellen einen Anteil von circa 10% aller peripherer CD4+ T-Zellen (Frey et al., 2005) (van Roon et al., 2006). Ein Fehlen der nTreg-Zellen in Mäusen resultiert in einem schweren Autoimmunsyndrom, durch Rekonstitution der CD4+CD25+-Zellen konnte diese Reaktion aber verhindert werden (Sakaguchi et al., 1995).

Frey et al. (2005) konnten zeigen, dass CD4+CD25+ auch in der Antigen-induzierten Arthritis entscheidend die Ausprägung der Erkrankung beeinflussen. Durch CD25-Depletion wurde die Arthritis sowohl in der akuten als auch chronischen Erkrankungsphase verstärkt.

Ein Transfer von CD4+CD25+-Zellen konnte die Schwere der Arthritis signifikant reduzieren. Hierbei zeigte sich, dass nTreg-Zellen nicht nur autoreaktive T-Zellen hemmen können, sondern auch die Immunantwort auf ein Fremdanigen wie mBSA. Dies legt nahe, dass die physiologische Funktion von nTreg-Zellen nicht nur darin liegt, Autoimmunität zu verhindern. Vielmehr können sie auch immunologische Entzündungsreaktionen eindämmen, um die resultierende Gewebsschädigung möglichst gering zu halten.

Die immunsupprimierenden Effekte der nTreg-Zellen werden durch einen direkten Zell-Kontakt der regulatorischen T-Zelle mit der Effektor-T-Zelle vermittelt. Dadurch kommt es zur Inhibition der IL-2-Produktion und zu einer Arretierung der Effektorzelle im Zellzyklus. Auch Antigen-präsentierende Zellen wie Monozyten und Dendritische Zellen können durch direkten Zell-Zell-Kontakt in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Auf diese Weise inhibieren nTreg-Zellen die Expression kostimulatorischer Moleküle und die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-6 (van Roon et al., 2006).

Neben den natürlichen regulatorischen T-Zellen kennt man eine Reihe von adaptiven regulatorischen T-Zellen. Hierzu zählen Tr1- und Th3-Zellen. Gemeinsam ist diesen Zellpopulationen, die Vermittlung der suppressiven Wirkung über die Sekretion von Zytokinen. Tr1-Zellen produzieren IL-10 und wenig TGF- β . Dadurch können sie sowohl Th1- als auch Th2-vermittelte Immunreaktionen hemmen. Th3-Zellen hingegen produzieren in TGF- β , das die antiinflammatorische Wirkung vermittelt (van Roon et al., 2006). Beide Zellpopulationen entstehen durch antigenspezifische Stimulation von T-Zellen unter tolerogenen Bedingungen (Bluestone and Abbas, 2003; Frey et al., 2005).

Appel et al. (2004) zeigten, dass bei RA-Patienten sowohl Tr1- als auch Th3-Zellen im entzündeten Synovialgewebe nachweisbar sind, jedoch in niedrigerer Zahl als bei Patienten mit einer reaktiven Arthritis.

2.2.5. Th-Zell-Subpopulationen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Im arthritischen Gelenk findet man eine deutliche Kumulation von CD4+ T-Zellen, also Th-Zellen. Die genetischen Prädisposition zur Ausprägung einer RA durch bestimmte MHC-II-gekoppelte Allele und besondere Rolle der Th-Zellen bei der Induktion und Erhaltung des Entzündungsgeschehens im arthritischen Gelenk deuten auf eine zentrale Rolle der Th-Zellen in der Pathogenese der RA hin.

Es konnte gezeigt werden, dass in der arthritischen Synovialmembran ausreichende Mengen des Th1-Zytokin IFN γ vorhanden sind, um vermittelt über eine Induktion von GM-CSF, die Lebensdauer von makrophagenähnlichen TypA-Synoviozyten deutlich zu erhöhen sowie die

Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, LFA-3, VCAM-1) durch Synoviozyten zu induzieren (Dolhain et al., 1996; Simon et al., 1994).

Diese sezernieren proinflammatorische Zytokine, $\text{TNF}\alpha$ und IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, in großen Mengen und fördern damit die Entzündungsreaktion im Synovialgewebe. $\text{IFN}\gamma$ aktiviert zudem Makrophagen, die $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-12 produzieren. $\text{IFN}\gamma$ kann darüber hinaus die Expression von MHC-II-Molekülen durch Synovialzellen induzieren und somit eine Antigenpräsentation für Th-Zellen ermöglichen (Boots et al., 1994). Synoviale Fibroblasten verfügen darüber hinaus im Gegensatz zu dermalen und Bindegewebsfibroblasten über kostimulatorische Fähigkeiten für T-Zellen (Looney et al., 1995).

Parallel zu dieser proinflammatorischen Wirkung der Th1-Zellen nehmen Th2-Zellen regulatorischen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen durch die Sekretion von IL-4 und IL-10. Eine antiinflammatorische Wirkung durch IL-4 und IL-10 konnte jedoch bis heute nur indirekt nachgewiesen werden: IL-4 kann die durch IL-1 stimulierte Sekretion von MMP-1 und MMP-3 durch TypB-Synovialzellen deutlich vermindern (Borghaei et al., 1998), die Zugabe von Anti-IL-10-Antikörpern kann in vitro die Expression proinflammatorischer Zytokine erhöhen. Th-Zellen können somit die Aktivität von Makrophagen, Synoviozyten und B-Zellen regulieren, ohne direkt an der Gelenkdestruktion beteiligt zu sein (Dayer and Burger, 1999).

2.3. Therapiekonzepte

Bei der Therapie der RA steht die symptomatische Behandlung von akuter Entzündung und chronischen Schmerzen im Vordergrund. Die kurz wirksamen nichtsteroidalen Antirheumatika (z.B. Acetylsalizylsäure, Ibuprofen, Diclofenac und Indometacin) besitzen analgetische und antiinflammatorische Eigenschaften. Sie führen zur Linderung von Gelenkschmerzen und -schwellung und verbessern so die Gelenkfunktion, ohne aber die fortschreitende Gelenkdestruktion zu verhindern. Die gastrointestinalen Störungen und die ulzerogene Wirkung sowie Leber- und Nierenschädigung und die Störung der Hämatopoese zählen zu den häufigsten Begleiterscheinungen bei Anwendung dieser Medikamente. Für einen optimalen Therapieerfolg der länger wirksamen Basistherapeutika (Sulfasalazin, Chloroquin, Goldverbindungen, Methotrexat und D-Penicillamin) sollte möglichst frühzeitig mit der Behandlung begonnen werden, um Gelenkzerstörungen zu verhindern und so die Funktion der Gelenke zu erhalten. Der Wirkungseintritt erfolgt bei den DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs), wie die Basistherapeutika auch genannt werden, verzögert

nach 2-3 Monaten. Bei Patienten müssen regelmäßig klinische Kontrollen und Laboruntersuchungen durchgeführt werden, um die schwerwiegenden Nebenwirkungen frühzeitig zu erkennen. Nebenwirkungsbedingte Therapieabbrüche sind relativ häufig (Herold, 1997). Glukokortikoidtherapie bei den entzündlich-rheumatischen Erkrankungen zeigt eine hervorragende und rasche antiphlogistische und immunsuppressive Wirkung, der allerdings noch ein relativ hohes Risiko von Nebenwirkungen entgegenstehen. Somit sind sehr strenge Indikationsstellungen notwendig. Die sogenannte „low-dose“-Therapie ist indiziert im Schub der RA bis zum Wirkeintritt der Basistherapeutika, bei chronischer Progression trotz intensiver Basistherapie und langfristig bei der Alters-RA (Lim and Conn, 2001). Schwere Krankheitsverläufe mit Nachweis von hohen Rheumafaktor-Titern und hohen Entzündungswerten sowie Blutbildveränderungen können durch Immunsuppressiva wie Methotrexat und Azathioprin beeinflusst werden. Bei Patienten mit schwerstem therapieresistenten Verlauf der RA werden T-Zell-gerichtete Immunsuppressiva wie das Cyclosporin A und Zytostatika (z.B. Cyclophosphamid) eingesetzt (Cush et al., 1999). Die immunsuppressive Behandlung zeigt eine hohe Wirksamkeit, die Nebenwirkungen, vor allem die Hepato- und Hämatotoxizität, sind allerdings beträchtlich. Nur bei schwersten Krankheitsverläufen sollte eine Behandlung mit Cyclophosphamid erfolgen, da sich das Risiko zur Ausbildung maligner Tumoren, speziell für Leukämie und Blasentumore, erhöht.

Der therapeutische Einsatz von biologisch wirksamen Medikamenten, wie monoklonale Antikörper gegen proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, TNF α), gewinnt in der klinischen Praxis zunehmend an Bedeutung (Afeltra, 2001; Forre et al., 2000). Als therapeutisch wirksam hat sich die Blockierung von TNF α durch monoklonale Antikörper wie Infliximab, Etanercept oder Adalimumab erwiesen (Aeberli et al., 2002; Gatto, 2006; Voulgari and Drosos, 2006). Es gibt allerdings deutliche Hinweise, dass durch eine anti-TNF-Antikörpertherapie das Risiko an schweren systemischen Infektionen zu erkranken und die Ausbildung von Malignomen erhöht ist (Bongartz et al., 2006).

Rituximab, ein monoklonale Antikörper gegen CD20, der zur Depletion von B-Zellen im peripheren Blut führt, wird bereits seit mehr als 10 Jahren bei malignen hämatologischen Tumoren eingesetzt. Mittlerweile ist Rituximab auch beim Versagen einer anti-TNF-Antikörpertherapie zugelassen (Dass et al., 2006).

Die Möglichkeiten der klinischen Anwendbarkeit von Antikörpern gegen weitere proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-15, IL-18, IL-23) in der Rheumatoiden Arthritis werden derzeit untersucht (Connell and McInnes, 2006). Eine molekulare Blockierung von IL-17 durch einen IL-17-spezifischen monoklonalen Antikörper hat sich im Tiermodell bereits als effektiv erwiesen, derzeit wird eine mögliche Neutralisierung dieses Zytokins durch aktive Immunisierung mit an virusähnliche Partikel gebundenem rekombinanten IL-17

experimentell untersucht (Rohn et al., 2006).

Pohlers et al. (2004) haben gezeigt, dass anti-CD4 monoklonale Antikörper in der Behandlung der akuten und frühen chronischen Phase der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) der Maus eine Verminderung der akuten Entzündung sowie eine Reduktion der Gelenkdestruktion bewirken. Die T-Zell-Reaktivität in vivo und die Produktion proinflammatorischer Th1-Zytokine wird gesenkt.

2.4. Modelle der Arthritis

Da die Ursache der chronisch-progressiv verlaufenden Erkrankung noch immer unbekannt ist und die Pathogenese Prozesse bisher nur unvollkommen geklärt sind, konnten bisher noch keine kausalen Therapieansätze gefunden werden. Die experimentellen Untersuchungen beim Menschen sind auf Körperflüssigkeiten und postoperativ bzw. biopsisch gewonnene Gewebeproben beschränkt. Untersuchungen sind an Patienten nur eingeschränkt durchführbar. Deshalb werden verschiedene Tiermodelle bei der Erforschung der Pathogenesemechanismen und bei der Prüfung neuer Pharmaka auf Wirksamkeit und Verträglichkeit eingesetzt. Das Krankheitsbild der RA kann leider in keinem experimentellen Arthritismodell vollständig widerspiegelt werden. Die Tiermodelle weisen immer nur Teilaspekte der menschlichen Erkrankung auf. Die Auslösung der Arthritis bei den Versuchstieren erfolgt dabei durch physikalische, infektiöse oder immunologische Mechanismen.

Arthritismodelle:

Adjuvans Arthritis (AA): Entwicklung einer Polyarthritis bei Ratten durch subkutane Injektion von Mykobakterien in Freund'schen Adjuvans (CFA) (Pearson, 1956)

Antigen-induzierte Arthritis (AIA): Entwicklung einer monoartikulären Arthritis durch subkutane Immunisierung mit einem Antigen in CFA und intraartikuläre Injektion des Antigens zur Induktion der Arthritis in Kaninchen (Dumonde, 1962); bei Meerschweinchen (Loewi, 1968); bei der Maus (Brackertz et al., 1977); und später bei Ratten (Griffiths, 1992)

Kollagen-induzierte Arthritis (CIA): Entwicklung einer Polyarthritis durch subkutane Injektion von nativem Kollagen Typ II in komplettem oder inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Courtenay et al., 1980; Trentham et al., 1977)

Öl- (OIA) und Pristan-induzierte Arthritis (PIA): Entwicklung einer Polyarthritis bei DA-Ratten durch subkutane Injektion von Mineralöl (inkomplettem Freund'schen Adjuvans) oder synthetischem Öl (Pristan) (Kleinau et al., 1991); Entwicklung einer Polyarthritis bei der Maus durch intraperitoneale Injektion von Pristan (Potter and Wax, 1981)

Proteoglykan-induzierte Arthritis (PGIA): Entwicklung einer Polyarthritis bei Balb/c-Mäusen durch wiederholte intraperitoneale Injektion von Proteoglykanen in komplettem oder inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Glant et al., 1987)

Streptokokken-Zellwand-induzierte Arthritis (SCWIA): Entwicklung einer chronischen Arthritis mit Spontanexazerbation bei der Ratte durch einmalige Gabe von Zellwandbestandteilen von Streptococcus pyogenes (Cromartie et al., 1977)

spontane Arthritis der MRL-lpr/lpr-Maus: Entwicklung einer spontanen Arthritis bei dem autoimmunen Mausstamm MRL-lpr/lpr (Hang et al., 1982)

HLA-B27 Arthritis: Entwicklung einer symmetrischen Polyarthritis mit extraartikulärer Beteiligung bei HLA-B27 transgenen Ratten unter nicht keimfreien Bedingungen (Taurog et al., 1994)

Human-murine Arthritis: Humane Synovialmembran und Knorpel werden zur Beobachtung von Zell-Knorpelinteraktionen unter die Nierenkapsel von SCID-Mäusen verpflanzt (Geiler et al., 1994). Synovialmembran oder synoviale Fibroblasten aus RA-Patienten werden in das Kniegelenk von SCID-Mäusen verpflanzt oder gespritzt (Sack et al., 1994)

TCR-transgene Arthritis: Entwicklung einer spontanen Polyarthritis bei TCR-transgenen K/BxN Mäusen, Antigen ist die ubiquitär vorkommende Glucose-6-Phosphat-Isomerase (Korganow et al., 1999; Matsumoto et al., 1999)

G6PI-Arthritis: Entwicklung einer T-Zell-abhängigen, chronischen peripheren symmetrischen Polyarthritis durch systemische Immunisierung genetisch normaler Mäuse mit Glucose-6-Phosphat-Isomerase (Schubert et al., 2004)

Diese Modelle spiegeln nur bestimmte Kriterien der RA wider, eine vollständige experimentelle Erfassung aller Teilaspekte der RA ist nicht möglich. Der für die RA typische schubweise Verlauf mit Exazerbation und die ausgeprägte Chronifizierung des Krankheitsbildes kann nur durch das Modell der Antigen-induzierte Arthritis (AIA) dargestellt werden. Auch im histologischen Bild bestehen die größten Ähnlichkeiten mit der RA.

Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) wurde von Dumonde und Glynn (1962) am Kaninchen entwickelt, kann aber auch in Meerschweinchen (Loewi, 1968), Ratten (Griffiths, 1992) und Mäusen (Brackertz et al., 1977) ausgelöst werden. Im Modell der AIA der Maus verwendeten wir empfängliche Mausstämme (z.B. C57BL/6), bei denen durch zweimalige Immunisierung

mit einem Antigen - methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA) – in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) eine Hyperreaktivität auf das Antigen erzeugt wird. Eine Verstärkung wird durch intraperitoneale Injektion von abgetöteten Bakterien - *Bordetella pertussis* - erreicht (Hunneyball et al., 1986). Die akute Entzündung wird durch die einmalige intraartikuläre Injektion des Antigens in das Kniegelenk ausgelöst und persistiert dann als chronische Arthritis und führt zur Gelenkdestruktion. Die Inzidenz dieses Modells liegt bei 100%, somit entwickeln alle Tiere eine Arthritis (Brackertz et al., 1977).

Es erfolgt die Ausbildung einer sogenannten Arthusreaktion, bei der sich Immunkomplexe zwischen dem intraartikulär applizierten Antigen und den vorhandenen zirkulierenden Antikörpern bilden und durch Komplementaktivierung ein Entzündungsgeschehen angestoßen (Cooke et al., 1983, 1985). In den ersten Stunden nach der Arthritisinduktion zeigen sich schon elektronenmikroskopisch nachweisbare Schäden der Knorpeloberfläche und ein fortschreitender Verlust von Proteoglykanen in der Knorpelmatrix, die Chondrozyten werden zunehmend nekrotisch. Am 7. Tag hat die akute Entzündungsphase ihren Höhepunkt erreicht. Morphologisch stellen sich tiefe Knorpelstrukturdefekte mit eröffneten Chondrozytenlakunen und eingewanderten Lymphozyten und Makrophagen dar. Im weiteren Verlauf, der der chronischen Phase entspricht, stehen histologisch ein granulozytäres Infiltrat sowie die Proliferation der Fibroblasten im Vordergrund, die als Reparaturmechanismus gedeutet werden kann (Henzgen et al., 1996).

Das histopathologische Bild der Gelenkdestruktion der Antigen-induzierten Arthritis im Mausmodell ist mit dem der Rheumatoiden Arthritis des Menschen vergleichbar: es finden sich eine synoviale Hyperplasie, ein mononukleäres Infiltrat der Synovialis, polymorphkernige Lymphozyten im Gelenkspalt sowie eine Knorpeldestruktion (Petrow et al., 1996a).

Durch lokale oder systemische Gabe kleinster Antigenmengen lässt sich bei der AIA im Arthritismodell ein akuter Entzündungsschub (Flare-up-Reaktion) auslösen, der die chronischen Entzündung überlagert und den Exazerbationen bei der RA ähneln (van de Putte et al., 1983).

Ähnlichkeiten zeigen sich auch in der medikamentösen Beeinflussbarkeit der AIA und der Rheumatoiden Arthritis, so dass sich das Modell der AIA auch auf dieser Grundlage gut für die Untersuchung der einzelnen Teilaspekte der Genese, des Verlaufes und der Therapie der RA eignet (Crossley et al., 1987).

2.5. Glukokortikoide (GC)

Kortikosteroide haben sich in den fünf Jahrzehnten ihrer Anwendung als unverzichtbare Therapieoption bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen bewährt. Spätestens seit 1948, als Philip S. Hench einen RA-Patienten mit Kortison erfolgreich behandelte, wurden Glukokortikoide zu einer essentiellen Komponente in der Behandlung vieler rheumatischer Erkrankungen (Buttgereit et al., 1998). Kortikoide greifen auf verschiedenen Ebenen in die Pathogenese der Erkrankung ein und wirken sowohl antiinflammatorisch als auch immunsuppressiv (Gold et al., 2001).

Mittlerweile ist gesichert, dass Kortikoide bei der RA nicht nur symptomatisch entzündungshemmend wirken, sondern auch selbst einen Basistherapie-Effekt besitzen. Kortikoide setzen nicht allein die Produktion verschiedener Zytokine herab, sie wirken auch auf Endothelzellen und verringern die Gefäßpermeabilität und die Adhäsion von Entzündungszellen an der Gefäßwand. Zudem hemmen sie die Fibroblastenproliferation im entzündeten Gelenk. Damit kann nicht nur eine Verminderung der akuten Entzündung, sondern auch eine Reduktion der progredienten Gelenkdestruktion erreicht werden.

Glukokortikoide (GC) werden in der Nebennierenrinde synthetisiert und stehen unter der Kontrolle des hypothalamisch-hypophysärem Systems. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können GC die Zellmembran passieren. GC üben ihre Effekte über die Bindung an den Glukokortikoid-Rezeptor (GR), der im Cytoplasma der Zielzelle lokalisiert ist, aus. Die GC-bindende Domäne ist das C-terminale Ende des Moleküls, der im Zytosol liegende Anteil des Rezeptors. In der Mitte des Moleküls befinden sich zwei Zink-Moleküle, gebunden an 4 Cystein-Reste, die sogenannten „Zink-Finger“. Die N-terminale Domäne ist in die Transkription mit eingebunden und bindet an die DNA (Muller and Renkawitz, 1991; Muller et al., 1991). Nach Aktivierung des intrazellulären Rezeptors, durch Abspaltung des Hitzeschock-Proteins 90 (HSP 90), bindet der Steroid-Rezeptor-Komplex an spezifische Stellen der DNA, das sogenannte „glucocorticoid responsive element“ (GRE). Dadurch wird die Transkription von Genen initiiert, der die Synthese verschiedener Proteine folgt (Gronemeyer, 1992).

Vor allem die Expression der Eiweiße der „Annexin-Familie“ (z. B. Lipocortin 1) als Inhibitor der Phospholipase 2 wird durch GC initiiert, dies führt zu einer verringerten Arachidonsäure-Freisetzung. Dadurch wird eine Hemmung der Synthese der Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane, plättchenaktivierender Faktor) erreicht. Der Glukokortikoid-Rezeptor-Komplex bindet nicht nur an das GRE und

bewirkt die Stimulierung der Transkription, ebenso erfolgt eine Bindung an das „negative glucocorticoid responsive element“ (nGRE). Damit wird die Bildung proinflammatorischer Zytokine (wie Tumor-Nekrose-Faktor, Interleukin 1, 2 und 6) und der Adhäsionsmoleküle durch Hemmung von Transkriptionsfaktoren unterbunden (Barnes and Adcock, 1993).

Neben den rezeptorvermittelten „genomischen“ Wirkungen existieren nichtgenomische Mechanismen, vermittelt durch membranständige Rezeptoren (Gametchu et al., 1993) sowie durch physikochemische Interaktionen mit der zellulären Membran (Buttgereit et al., 1998).

2.6. Glukokortikoide (GC) und ihre Anwendung

Fünf Jahrzehnte der experimentellen und klinischen Erfahrung haben einen Wandel in der Kortikoidtherapie bewirkt. Kortikoide wirken über zwei unterschiedliche Mechanismen. Zum einen erfolgt über den genomischen Effekt die Bildung anti-inflammatorischer Proteine, die pro-inflammatorische Zytokine hemmen. Dieser Effekt wird durch geringe Dosen ausgelöst, kommt aber erst spät zur Geltung. Bei Verwendung hoher Dosierungen treten die nicht-genomischen Effekte in Kraft durch Veränderungen an der Zellmembran. Dieser Mechanismus findet rasch nach Beginn der Behandlung statt. Die Risiken der Kortikoid-Nebenwirkungen sind extrem selten, wenn moderne Applikationsformen und Therapieregime eingesetzt werden: Sehr hohe Dosen für eine kurze Zeit im Stadium der akuten Entzündung der Krankheit, niedrige Dosierungen in den Phasen der Langzeitbehandlung während des chronischen Stadiums (Kaiser, 2003).

Die parenterale Pulstherapie wird bei bisher therapierefraktärer Rheumatoider Arthritis eingesetzt. Angewandt werden 250 – 1000 mg (Dosisangaben in Prednisolonäquivalent) an drei aufeinanderfolgenden Tagen, dabei zeigte nur die Gabe von 1000 mg Methylprednisolon intravenös einen Effekt zwischen dem Start der Therapie und dem Einsetzen der Wirkung der Basistherapeutika (Weusten et al., 1993). Unerwünschte Nebenwirkungen wurden häufig beobachtet, zeigten sich aber meist nur in milder Ausprägung.

Die Indikationen der parenteralen Pulstherapie sind eng umschrieben und betreffen vor allem lebensbedrohliche Krisensituationen bei systemischen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen, den Kollagenosen und Vaskulitiden. Bei der Arteriitis temporalis mit Beteiligung der A. retinae und Erblindungsgefahr wird die parenterale Pulstherapie ebenfalls angewendet.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass eine Low-dose-Therapie mit Kortikoiden eine Verzögerung der Gelenkdestruktion um einige Jahre bewirkt. Bei der oralen Low-dose-Therapie erfolgt die Gabe von 5 - 10 mg pro Tag (Amano, 2002). Täglich 7,5 mg (Dosisangaben in Prednisolonäquivalent) stellen eine effektive Therapie dar, eine schrittweise Reduktion auf eine deutlich kleinere Dosis ist im Verlauf möglich und reduziert somit das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen weiter.

Ein Schutz vor Gelenkzerstörung kann bereits mit niedrig dosierten Kortikoiden erzielt werden. Erstmals konnte die Arbeitsgruppe um Kirwan nachweisen, dass die Applikation von Prednisolon (7,5 mg / Tag) über einen Zeitraum von zwei Jahren bei Patienten mit einer frühen, aktiven Rheumatoiden Arthritis zusätzlich zu frei wählbarer Basistherapie im Vergleich zu Placebo zu einer Verlangsamung bzw. zum Aufhalten der radiologisch fassbaren Gelenkzerstörung führt (Kirwan, 1995). Eine im deutschsprachigen Raum erstellte doppelblinde Low-dose-Prednisolon-Therapie-Studie bestätigte diese Ergebnisse. 196 Teilnehmer mit einer seit weniger als zwei Jahren bestehenden aktiven RA erhielten zusätzlich zur Basistherapie mit parenteralem Gold oder Methotrexat (MTX) randomisiert Prednisolon (als Decortin H) oder Placebo (Rau et al., 2000). Die Prednisolon-Dosis war mit 5 mg / Tag sogar noch niedriger als in der Kirwan-Studie, zeigte aber auch eine deutliche Verzögerung der radiologisch ermittelten Progression der Gelenkzerstörung. Dieser Effekt ist mit einer alleinigen Basistherapie nicht zu erreichen.

Weitere Studien belegten ebenso die Effektivität der Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden in niedriger Dosierung.

Eine Prednisolon-Dosis von 5 mg / Tag hat sich als ausreichend erwiesen, oftmals kann eine noch niedrigere Dosis eine suffiziente Behandlung darstellen. Diese „very-low-doses“-Therapie wird über eine langsame Reduktion in kleinen Schritten von einem halben Milligramm auf ein Milligramm über eine sehr lange Zeitdauer erreicht (Kaiser, 2003). Eine zu schnelle Reduktion führt zur Exacerbation der Erkrankung oder zum Glukokortikoidentzugs-Syndrom. Dieses tritt besonders bei abrupter Beendigung oder zu rascher Reduktion einer längeren und höher dosierten Glukokortikoidtherapie auf, und zeigt sich durch Symptome wie Fieber, Anorexie, Depression, Schwäche, Hypotonie, diffusen Myalgien und Arthralgien.

Die Low-dose-Therapie mit Kortikoiden bei der RA ist indiziert zur Überbrückung bis zum Wirkeintritt der Basistherapie und als langfristige Behandlung der chronischen Progression.

Für die systemische Gabe von GC gelten folgende Definitionen (Buttgereit et al., 2002):

- Niedrigdosiert (low dose): < 7,5 mg pro Tag Prednisolonäquivalent (PÄ)
- Mittlere Dosis (medium dose): > 7,5 mg, aber < 30 mg pro Tag PÄ

- Hohe Dosis (high dose): > 30 mg, aber < 100 mg pro Tag PÄ
- Höchstdosis (very high dose): > 100 mg pro Tag PÄ
- Puls-Therapie (pulse-therapy): > 250 mg pro Tag für einen oder mehrere (3) Tage

Die verschiedenen synthetischen GC-Präparate haben unterschiedliche Wirkungsstärken, so dass jeweils das Prednisolonäquivalent (PÄ) als Hinweis zur richtigen Dosierung angegeben wird. So kann man davon ausgehen, dass 1 mg Dexamethason 7,5 mg Prednisolon entsprechen (Kaiser, 2003).

2.7. Glukokortikoid-Nebenwirkungen

Die unerwünschten Wirkungen bei der Therapie mit Kortikoiden sind vielgestaltig, dabei hängen die Häufigkeit und das Ausmaß von Dosis und Therapiedauer ab. Dazu kommen patientenabhängige Faktoren wie Alter, Geschlecht, genetische Disposition, Komorbiditäten und Komedikationen.

Durch die Zunahme der Glukoneogenese und der verringerten Glukoseaufnahme in die Muskelzelle kann ein Diabetes mellitus und eine Hyperlipoproteinämie entstehen. Die vermehrte Natrium- und Wasserretention und die stärkere Kaliumausscheidung können zu Hypertonie, Ödeme und Hypokaliämie führen, unter Langzeittherapie kommt es zur Ausbildung eines iatrogenen Cushing-Syndrom's mit Vollmondgesicht und Stammfettsucht. Haut- u. Muskelatrophie sind Folgen der katabolen Wirkung der Kortikoide (Laan et al., 1999). Besonders bei Kindern und Jugendlichen zeigen sich unter längerer Kortikoidtherapie Wachstumsretardierung und Hüftkopfnekrosen. Das Infektionsrisiko steigt durch die immunsuppressiven Effekte.

Die alleinige Kortikoidbehandlung bedingt kein generell gesteigertes Ulkusrisiko, in Kombination von Glukokortikoiden mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) steigt das Risiko der Ausbildung eines Magenulkus allerdings erheblich, so dass bei gleichzeitiger Behandlung mit einem NSAR die prophylaktische Gabe eines Protonenpumpenhemmers als Magenschutz erfolgen sollte (Piper et al., 1991).

GC können einige neurologische Veränderungen hervorrufen, viele Patienten verspüren nach Therapiebeginn einen leicht euphorisierenden Effekt. Echte Psychosen treten gelegentlich bei Gabe von mehr als 20 mg Prednisolonäquivalent pro Tag auf, Schlaflosigkeit und Depression können auch bei niedriger Dosierung beobachtet werden (Boeger and Kellner, 2001).

Selten ist das Auftreten von Nebenwirkungen wie Glaukom und Katarakt, Hirsutismus, Fettleber (Saag, 2001).

Eine Osteoporose entsteht unter Langzeittherapie mit GC durch eine verminderte Bildung von Knochengrundsubstanz und durch eine vermehrte Calcium-Mobilisation zur Kompensation renaler Calcium-Verluste und einer enteralen Minderresorption von Calcium. Die Osteoporose ist die einzige relevante Nebenwirkung der niedrig dosierten Kortikoid-Dauertherapie. Die Leitlinien des American College of Rheumatology empfehlen für Patienten, die mindestens 3 Monate 5 mg Prednisolon oder mehr erhalten, eine Osteoporose-Prophylaxe mit Calcium und Vitamin D, gegebenenfalls auch mit Bisphosphonaten (Devogelaer et al., 2006; Laan et al., 1999; Nishimura and Ikuyama, 2000).

Durch die verschiedenen Therapiekonzepte wird versucht, die Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten. Durch Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der GC ist man bemüht, die unerwünschten Wirkungen zu vermindern oder gar zu beseitigen.

2.8. Lipotalon

Auf dem Gebiet der Pharmakologie erfolgt seit einiger Zeit die Entwicklung neuer galenischer Darreichungsformen, durch die eine effektivere und gezieltere Wirkung der Medikamente erreicht werden soll. Durch den verbesserten Wirkangriff ist anzunehmen, dass die Häufigkeit und das Ausmaß der Nebenwirkungen gesenkt werden.

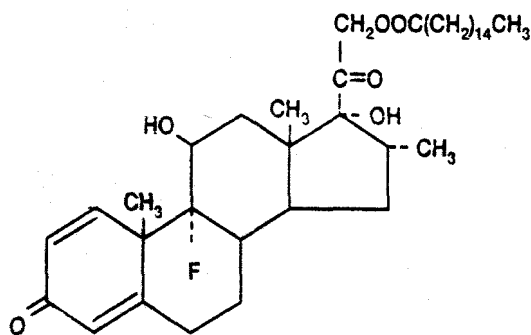
Lipotalon ist ein Kortikoid in einer neuartigen galenischen Form: Lipophiles Dexamethason-Palmitat in Sojabohnenöl gelöst, von einer Lecithinhülle umgeben, bildet kleine ca. 200 nm große Medikamentenvehikel (drug carrier), die sogenannten Lipidmikrosphären (Abb.2). Diese Lipidmikrosphären sind wie die Liposomen eine neuartige galenische Zubereitungsform, die als Arzneimittelträger eine gezielte Wirkstofffreigabe (drug targeting) ermöglichen. Im Unterschied zu den Liposomen sind Lipidmikrosphären jedoch 2 Jahre bei Zimmertemperatur haltbar und homogener in ihrer Größe.

In-vitro-Versuche zeigen, dass das inkorporierte Dexamethason erst in den Makrophagen freigesetzt wird. Die Chemotaxis- und Phagozytose-Aktivität der Immunzellen lässt dadurch deutlich nach und der entzündliche Prozess wird eingedämmt. In Studien erzielte in Lipidmikrosphären verpacktes Dexamethasonpalmitat eine um 5,6 mal höhere Wirksamkeit im entzündeten Gewebe als wasserlösliches Dexamethason (Abb.1) (Yokoyama et al., 1985).

Bei intraartikulären Injektionen mit Kristallsuspensionen kommt es gelegentlich zu entzündlichen Reaktionen, den so genannten Kristallsynovitiden. Sie rufen Schmerzen hervor und führen zu Gelenkschwellungen und -ergüssen. Auf Grund seiner innovativen Galenik sind derartige Nebenwirkungen bei Lipotalon nicht zu befürchten. Das Präparat besitzt insofern eine Alleinstellung, als es in seiner Wirksamkeit mit der Gabe von

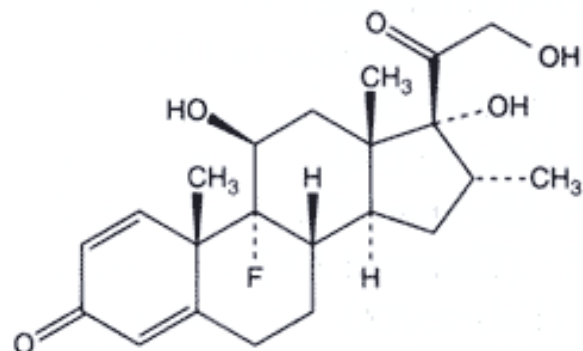
Kristallsuspensionen vergleichbar ist, jedoch ohne dass eine kristallinduzierte Synovitis beobachtet worden wäre. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die periartikuläre Injektion und Infiltration bei Epikondylitis humeri, wo Lipotalon bei über 75 Prozent der Patienten eine deutliche Besserung des Belastungsschmerzes zeigt und eine "sehr gute" bis "gute" Wirksamkeit und Verträglichkeit bietet (Bär et al., 1997).

Lipotalon wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um die Wirksamkeit bei der AIA der Maus, einem Modell der Rheumatoiden Arthritis des Menschen zu untersuchen. Dabei sollen neben den klinisch-histologischen Beeinflussungen auch die Wirkungsmechanismen auf zellulären Ebene untersucht werden.



Lipotalon

(Dexamethason-21-Palmitat)



Dexamethason

(Dexamethason-Phosphat)

Abb.1: Strukturformel von Lipotalon und Dexamethason

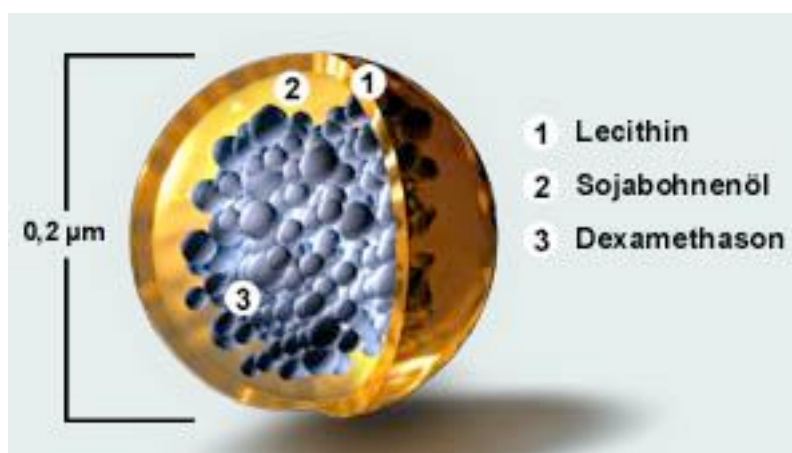


Abb.2: Lipidmikrosphären

3. Fragestellung

Die RA ist eine häufig auftretende Autoimmunerkrankung, mit einer Prävalenz von über 1% stellt sie ein weltweites Problem dar. Die RA kann in fast allen Lebensstadien auftreten und nahezu alle Gelenke befallen. Dabei kann die destruierende Arthritis bis zur vollständigen Funktionsunfähigkeit führen. Sie stellt daher ein erhebliches persönliches wie sozioökonomisches Problem dar.

Trotz des bekannten Spektrums an unerwünschten Wirkungen sind GC aufgrund des schnellen Wirkeintrittes und des hohen antiinflammatorischen Potentials unverzichtbarer Bestandteil einer zeitgemäßen Behandlung in der Rheumatologie. Die Kortikoidtherapie ist auch fast 60 Jahre nach ihrer Einführung immer noch in Bewegung. Ein gezielter Einsatz der Medikamente in effektiver Wirkdosis nach anerkannten Therapieschemata hat bereits in den letzten Jahren zu einer Reduktion der Nebenwirkungen geführt. Durch effektivere Darreichungsformen und neue galenische Ansätze muss versucht werden, diese Entwicklung weiter voranzutreiben. Dazu bieten in Liposomen verkapselt GC einen entscheidenden Ansatz. Durch diese galenische Form ist ein gezielterer Wirkangriff, eine Reduktion der Nebenwirkungen sowie eine Verringerung der erforderlichen Dosis bei besserer Wirksamkeit zu erwarten. Erste Untersuchungen dazu liegen in der vorgehend erwähnten Literatur bereits vor.

Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) der Maus, ein Modell der Rheumatoiden Arthritis des Menschen, ist eine T-Zell-abhängige chronische Erkrankung, die durch GC gut zu beeinflussen ist. Um die Wirkungsmechanismen einer Therapie mit freien und liposomal verkapselten GC in vivo sowie auf zellulärer Ebene zu analysieren, wurde Lipotalon, ein in Lipidmikrosphären gebundenes Dexamethason, im Modell der AIA eingesetzt und mit der Wirkung von freiem Dexamethason verglichen.

Folgende Fragestellungen sollten dabei bearbeitet werden:

- Welche Dosis an Lipotalon erweist sich im AIA-Modell der Maus als klinisch und histologisch wirksam?
- Ist ein Reboundeffekt nach Absetzen der Therapie mit Glukokortikoiden nachweisbar?
- Wie stellen sich die Therapieeffekte im Verlauf der Arthritis dar?
- Kann ein Einfluss auf die „delayed-type hyperreactivity“ (DTH-Reaktion) als Maß der T-Zell-Reaktivität in vivo nachgewiesen werden?
- Unterscheidet sich Lipotalon in seiner Wirksamkeit von freiem Dexamethason?
- Zeigen sich Konzentrationsänderungen der Serum-Antikörper gegen Gewebsantigene (Proteoglykane, Kollagen I und II) sowie gegen das arthritisauslösende Antigen mBSA als

Ausdruck des Effektes auf die humorale Immunität?

- Kann ein immunmodulatorischer Effekt von Dexamethason mit einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in vivo anhand der Immunglobulin-Subklassen IgG1, IgG2a und IgG2b nachgewiesen werden?
- Welchen Einfluss hat das in vivo verabreichte Lipotalon bzw. freie Dexamethason auf die Zytokinproduktion von isolierten Peritonealmakrophagen und Milzlymphozyten, lässt sich eine Verlagerung des Th1/Th2-Gleichgewichtes darstellen?
- Wie wirkt sich die In-vitro-Applikation von Lipotalon auf das Zytokinspektrum von Peritonealmakrophagen und Milzlymphozyten aus und ergeben sich Hinweise auf eine Beeinflussung des Th1/Th2-Gleichgewichtes?

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Geräte

Außentaster (Mikrometer) Oditest; Kröplin, Schlüchtern
Begasungsbrutschrank Cellstar; Nunc, Wiesbaden
Biofuge 13, Heraeus Instruments, Gera
Edelstahl-Gewebesiebe, Tissue Grinder Kit, 80 mesh, SIGMA; Deisenhofen
ELISA-Reader EAR 400FT, SLT Labinstruments Deutschland, Crailsheim
Feinwaage MB BC 100, Sartorius, Göttingen
Finntip Multistepper, Labsystems, Helsinki, Finnland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer; Feinoptik, Bad Blankenburg
Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen; Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Jouan CR312; Jouan, Unterhaching
Laminar-Flow-Box; Elektromat, Dresden
Mehrkanalpipetten; Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Jenamed; Carl Zeiss, Jena
Multipipette; Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus Akku; Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt
Präparationsbesteck; Aeskulap, Tuttlingen
Schlittenmikrotom, Jung AG, Heidelberg
Sterilisator, MLW Dentalfabrik, Treffurt
Tischzentrifuge Biofuge 13; Heraeus, Hanau
Waschgerät Columbus; SLT Laborinstruments, Crailsheim
Wasserbad mit Thermostat, Julabo, Seelbach
Zellharvester Unifilter-96; Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

4.1.2. Verbrauchsmaterialien

Einmalfilter (0,2 µm); Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalspitzen (10, 100 und 1000 µl); Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen und -kanülen; Braun-Melsungen, Melsungen
Einmalstangenpipetten in verschiedenen Größen; Greiner, Nürtingen
ELISA-Kit Pharmingen OptEIA zur Interleukin-10- und Interleukin-12-Bestimmung; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eppendorfbehälter; Eppendorf, Hamburg
Gewebekulturflaschen in verschiedenen Größen; Greiner, Nürtingen
Gewebekulturplatten 6-Well, 12-Well, 24-Well und 96-Well; Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen (60/15 mm); Greiner, Nürtingen
Mikrotiterplatten für Zytokin-ELISA (Maxisorb); Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten für Immunglobulin-ELISA; Greiner, Nürtingen
Multistepper Pipet Tips, 1500µl, Sigma, St. Louis, USA
Objektträger und Deckgläser; Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten aus Glas, Rudolf Brand, Wertheim
Polystyrol- (PS-) Röhrchen (14 ml); Greiner, Nürtingen
Polypropylen- (PP-) Röhrchen (50 ml); Greiner, Nürtingen
TopSeal Abdeckfolie; Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Zellsiebe; Falcon, Gräfelfing-Locham

4.1.3. Chemikalien

Äther, Hoechst AG, Frankfurt
Bordetella pertussis (hitzeinaktiviert); Chiron Behring, Marburg
BSA (Bovines Serum Albumin); Sigma, Deisenhofen
Concanavalin A (Con A); Amersham, Freiburg
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), flüssig, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Ethyl-diamin-tetraessigsäure (EDTA); Sigma, Deisenhofen
Eosin-Natrium, Laborchemie Apolda, Apolda
Fetales Kälberserum (FCS); Gibco, Karlsruhe
Hämatoxylin, Merck, Darmstadt
HEPES-Puffer, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
HCl; Roth, Karlsruhe

HCOOH; Sigma, Deisenhofen
Heparin (Liquemin N20000); Roche, Grenzach-Wyhlen
H₂O₂; Roth, Karlsruhe
KCl; Roth, Karlsruhe
KH₂PO₄; Roth, Karlsruhe
Komplettes Freundsches Adjuvans (CFA); Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol; Gibco, Karlsruhe
Methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA); Sigma, Deisenhofen
MgCl₂; Sigma, Deisenhofen
Mycobacterium tuberculosis (Stamm H37RA); Becton Dickinson, Heidelberg
NaCl; Sigma, Deisenhofen
Na₂CO₃; Roth, Karlsruhe
NaHCO₃; Merck, Darmstadt
NaOH; Sigma, Deisenhofen
Na₂PO₄ ; Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat; Gibco, Karlsruhe
NH₄Cl; Sigma, Deisenhofen
2 N H₂SO₄; Sigma, Deisenhofen
o-Phenylendiamin; Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat, Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin/Glutamin; Gibco, Karlsruhe
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium; Gibco, Karlsruhe
Streptavidin-Peroxidase; Dianova, Hamburg
TRIS; Sigma, Deisenhofen
Tween 20; Sigma, Deisenhofen
Zitronensäure; Sigma, Deisenhofen

4.1.4. Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Puffer

Lösungen für Zellkultur, -sortierung und -analyse

Komplettes Medium

DMEM oder RPMI 1640 supplementiert mit:

10% FCS

2 mM Glutamin

10 mM Hepes

100 U/ml Penicillin

0,1 mg/ml Streptomycin

0,05 mM 2-Mercaptoethanol

1 mM Natriumpyruvat

Spülmedium zur Zellpräparation

DMEM supplementiert mit

700mg/l NaHCO_3

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

8 g NaCl

1,44 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,2 g KH_2PO_4

0,2 g KCl

in 1 l Aqua bidest. lösen und auf pH 7,4 einstellen

Ammoniumchlorid/TRIS zur Erythrozyten-Lyse

1. 0,83% NH_4Cl (7,47g in 900ml H_2O)

2. TRIS (2,059g in 100ml H_2O) auf pH 7,65

3. 9 Teile von 1. + 1 Teil von 2. mischen, auf pH 7,2 einstellen

Türksche Lösung zum Auszählen der Zellen

in 2%iger Essigsäure einige Kristalle Gentianaviolett auflösen, filtrieren und bei 4°C aufbewahren

Puffer für ELISA

Beladungspuffer für ELISA (Bikarbonatpuffer)

0,84 g NaHCO_3 in 100 ml Aqua bidest. lösen

Waschpuffer für ELISA

0,05% Tween 20 gelöst in PBS

Substratpuffer für Peroxidase

2,1 g Zitronensäure
16,2 ml 1 N NaOH
in 84 ml Aqua bidest. lösen

Substratlösung für Peroxidase (SOPD)

2 mg/ml o-Phenylendiamin (oPD) gelöst in Zitratpuffer
vor dem Auftragen Zugabe von 25 µl/ml H₂O₂ (3%)

Probenpuffer für ELISA

1% BSA, 0,05% Tween 20 gelöst in PBS

Substratpuffer für Alkalische Phosphatase

100 ml 0,1M TRIS
20 mg MgCl₂

Substratlösung für Alkalische Phosphatase (SpNPP)

2,6 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in Substratpuffer

Stopplösung für die Alkalische Phosphatase

5,3 g Na₂CO₃ auf 100 ml Aqua bidest.

Lösungen für Histologie

Entkalkungslösung

25%ige HCL
100%ige HCOOH
70 g AlCl₃
auf 1 l Aqua bidest.

4.1.5. Verwendete Therapiesubstanzen

Lipotalon® (Dexamethason-21-palmitat, C₅₈H₅₉FO₆, M: 630,88 g/mol), Merckle GmbH, Blaubeuren

Dexamethason® (Dexamethason, C₂₂H₂₉FO₅, M: 392,5 g/mol), Sigma-Aldrich GmbH, München

4.1.6. Versuchstiere

Für die Untersuchungen am Modell der AIA der Maus wurden C57Bl/6-Mäuse beiderlei Geschlechts im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Die Tiere wurden vom Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena (Beutenberg-Campus, Jena) oder von Charles River Laboratories, Sulzfeld bezogen. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Gruppen von 10 Tieren im Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden mit standardisierter Fütterung (Altromin-Pellets) und Wasser ad libitum. Die Tierversuche wurden durch das Thüringer Verwaltungsamt genehmigt.

4.2. Methoden

4.2.1. Immunisierung und Arthritisinduktion

Für ein besseres Verständnis des Zeitablaufes wird in den nachfolgenden Ausführungen der Tag der Arthritisauslösung als Tag 0 (d0) bezeichnet.

Für die Erstimmunisierung wird eine Lösung des Antigens mBSA (2 mg/ml) in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und mit gleichem Volumen CFA (mit *Mycobacterium tuberculosis* auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml supplementiert) gemischt und eine stabile Emulsion erzeugt.

Durch subcutane (s.c.) Injektion von 100 μ l dieser Emulsion (entspricht 100 μ g mBSA) in die rechte Flanke jeder Maus und gleichzeitiger intraperitoneale (i.p.) Injektion von 10^9 hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis*-Keimen am Tag -21 erfolgt die Immunisierung. Die Reimmunisierung („Boosterung“) wird am Tag -14 in gleicher Weise durchgeführt, das Antigen wird dabei s.c. dorsal in die Schwanzwurzel injiziert.

Am Tag 0 wurde unter Äthernarkose durch intraartikuläre Injektion des Antigens in das rechte Kniegelenk (100 μ g mBSA in 25 μ l 0,9 % NaCl-Lösung) die Arthritis ausgelöst. Das kontralaterale Kniegelenk bleibt unbehandelt.

4.2.2. Beurteilung der Schwere der Arthritis

Gelenkschwellung

Durch die Arthritisinduktion kommt es im rechten Kniegelenk zu einer deutlichen Gelenkschwellung, insbesondere in der akuten Phase der AIA. Die Bestimmung der Gelenkschwellung erfolgt unter Verwendung des Außentaster (Mikrometer) Oditest. Die Differenz aus dem rechten arthritischen und dem kontralateralen normalen Kniegelenk dient als Maß für die klinische Schwere der Arthritis.

Histologie

Nach dem Töten der Tiere wurden beide Kniegelenke entnommen und enthäutet, in gepuffertem 4,5%igen Formalin für mindestens 24 h bei Raumtemperatur fixiert und weitere 24 h mit Ethyl-diamin-tetraessigsäure (EDTA) entkalkt. Über eine aufsteigende Alkoholreihe werden die Gelenke entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 3 bis 4 frontale Schnitte des gesamten Gelenkes angefertigt und auf einen Objektträger aufgetragen, in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und im Anschluss mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Veränderungen im Gelenk wurden durch zwei unabhängige Begutachter ohne Kenntnis der Versuchsgruppen beurteilt. Zur Bewertung wird das in Tabelle 2 dargestellte Auswertschema herangezogen. Die Summe der Punkte für Mesothelveränderungen und Infiltration ergibt als Maß für die Stärke der Entzündung den Synovialisindex. Der Knorpelindex als Maß für die Stärke der Gelenkdestruktion wird aus der Summe von Knorpelschädigung und Pannus errechnet. Der Gesamt-Arthritisscore errechnet sich aus der Summe von Synovialis- und Knorpelindex.

Tabelle2: Histologische Kriterien zur Beurteilung der Schwere der AIA

Punkte Mesothelveränderungen	
0,5	Geringe Abnormitäten, Schwellung, kubische Transformationen einschichtig, herdförmig
1	Herdförmige kubische Transformationen, einschichtig, an mehreren Stellen
1,5	Wie 1, jedoch große Teile der Tunica synovialis oder sämtliche Areale umfassend
2	Kubische Transformationen, mehrreihig, herdförmig
2,5	Wie 2, jedoch große Teile der Tunica synovialis oder sämtliche Areale umfassend, Nekrosen möglich
3	Mehrreihiges Mesothel mit ausgedehnten Nekrosen
Punkte Infiltration	
0,5	Einzelne schütterte, herdförmige Infiltrate von Lymphozyten/Plasmazellen auf die Rezessus beschränkt
1	Herdförmige Infiltrate an mehreren Stellen, aber beschränkt
1,5	Diffuse Infiltrate, beschränkt
2	Herdförmige Infiltrate, ausgedehnt im gesamten Gelenk
2,5	Diffuse Infiltrate, ausgedehnt im gesamten Gelenk
3	Ausgeprägte Infiltrate, auf die Kapsel übergreifend oder mit herdförmiger Aggregation
Punkte Knorpelschädigung	
0,5	Oberflächliche Nekrose in einer Gelenkregion, dieselbe nicht vollständig umfassend
1	Oberflächliche herdförmige Nekrose in mehr als einer Gelenkregion
1,5	Nekrosen in mehr als einer Region oder eine Region vollständig umfassend
2	Nekrosen bis zur Tidemark reichend, herdförmig ausgeprägt
2,5	Nekrosen bis zur Tidemark reichend, in mehr als einer Gelenkregion
3	Ausgedehnte tiefgreifende Nekrosen mindestens bis zur Tidemark, an mehreren Stellen
Punkte Pannusbildung	
0,5	Angedeutete Entwicklung an ein bis zwei Stellen mit geringer Infiltration
1	Entwicklung an ein bis zwei Stellen mit deutlicher Infiltration
1,5	Entwicklung an mehreren Stellen mit deutlicher Infiltration und zungenförmiger Auflagerung auf der Knorpeloberfläche oder zungenförmiger Infiltration an einer Stelle
2	Entwicklung an mehreren Stellen mit zungenförmiger Infiltration oder flaches Überwachsen einer Gelenkfläche
2,5	Deutlich ausgeprägte Entwicklung an mehreren Stellen mit zungenförmiger Infiltration oder zungenförmigem Überwachsen einer oder mehrerer Gelenkflächen
3	Ausbildung an mehr als vier Stellen oder exzessive Ausbildung an zwei Stellen

4.2.3. Messung der zellulären Immunreaktivität in vivo

Theoretische Grundlagen

Als Maß für die zelluläre Immunreaktivität wurde der Maus-Ohr-Test nach einem modifizierten Schema nach Farmer et al. (1986) durchgeführt.

Durch Applikation des Antigens in die Haut des Mausohres wird eine Immunreaktion vom Tuberkulintyp, verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (Typ IV-Reaktion), hervorgerufen. Dabei kommt es 24 bis 72 Stunden nach Antigenapplikation in die Haut zu einer Infiltration mit sensibilisierten T-Lymphozyten. Diese Reaktion kann durch T-Zell-Transfer übertragen werden. Die verantwortlichen T-Zellen wurden als sogenannte TH/DTH-Zellen beschrieben (Farmer et al., 1986). Es konnte im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis ein Zusammenhang zwischen der Schwellung des Ohres und der Kniegelenksschwellung gezeigt werden (t Hart et al., 1994). Dies macht man sich im Maus-Ohr-Test zur Bestimmung der „delayed-type hyperreactivity“ (DTH-Reaktion) als Maß für die zelluläre Immunreaktivität zu Nutze.

Durchführung

Zur Abschätzung der Stärke der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion (DTH-Reaktion) wurde den Tieren 7 Tage (d7) nach der Arthritisinduktion unter Äthernästhesie eine Antigenlösung von 5 µg mBSA in 10 µl PBS intrakutan in ein Ohr injiziert. Die Dicke des Ohres wurde vor der Antigenapplikation sowie 24 und 48 Stunden danach in Äthernästhesie gemessen. Die Ohrschwellung als Zeichen der Immunreaktion ergibt sich aus der Differenz der Ohrdicke und dient als Maß für die Stärke der zellulären Immunreaktivität.

4.2.4. Serumgewinnung

Am Versuchsende (Tag 19 bzw. 21) wurde nach Äthernarkose der C57BL/6-Mäuse die Arteria carotis einseitig eröffnet. Die Blutgewinnung erfolgte in Bechergläser individuell für jedes Tier. Zur Gerinnung wurde das Blut 4 Stunden bei 4°C stehen gelassen und das Serum nach Zentrifugation als Überstand gewonnen. Die Seren wurden bis zur weiteren Analyse bei -70°C aufbewahrt.

4.2.5. Zellpräparation und Zellkulturen

Makrophagen

Nach Narkotisierung, Entbluten und Tötung der Versuchstiere in Äthernarkose erfolgte eine Desinfektion durch vollständiges Eintauchen in 70%igen Alkohol. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in der Laminarflowbox durchgeführt.

Das Peritoneum wurde freipräpariert, in die Bauchhöhle wurden 5 ml kaltes (4°C) PBS mit 5 IE Heparin/ml eingespritzt und der Bauch ca. 30 Sekunden massiert. Der entstandene „Aszites“ wurde abgesaugt, das Peritoneum eröffnet und eine nochmalige Spülung des Bauchraumes mit 3 ml Heparin-PBS vorgenommen, um eine maximale Zellausbeute zu erzielen. Die so gewonnenen Peritonealexsudatzellen wurden in eisgekühlten Zentrifugenröhrchen gesammelt. Eine weitere durchgehende Kühlung bis zur Inkubation ist unerlässlich, da anderenfalls eine Adhärenz der Makrophagen an den Gefäßwänden auftritt.

Ein dreimaliger Waschvorgang, durch Abzentrifugieren der Peritonealexsudatzellen 10 min bei 1000 rpm, erfolgte zur Reinigung der Zellen. Danach wurden die Überstände abgegossen und mit 5 ml kalter PBS versetzt. Die Resuspension der Zellen nach dem Waschvorgang erfolgte in 10 ml komplettem RPMI-Medium bzw. für eine spätere TNF-Bestimmung in serumfreiem Makrophagenmedium (SFM). Nach Zählung in Türk'scher Lösung wurde die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Makrophagen adhärieren an Plastikoberflächen, diese Eigenschaft wurde für die Isolation der Makrophagen aus den Peritonealexsudatzellen genutzt: nach zweistündiger Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ in 24-Well-Gewebekulturplatten mit 1 ml Zellsuspension je Well wurden die Platten vorsichtig geschüttelt, die Überstände abgesaugt, die Wells drei Mal mit 37°C warmen, serumfreien Medium gespült und anschließend wieder mit 1 ml komplettem RPMI-1640-Medium bzw. SFM pro Well aufgefüllt. Die auf diese Weise erhaltenen adhärenen Zellen sind morphologisch und funktionell zu >90% Makrophagen (Gifford and Lohmann-Matthes, 1987; Nicaise et al., 1993).

Während der anschließenden Inkubation der Makrophagen erfolgte eine Stimulierung mit 1 µg LPS/ml bzw. keine Stimulation für eine unstimulierte Kontrollgruppe. Nach 24 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Überstände abgesaugt und zum Entfernen von Zellresten 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen portioniert bei -70°C gelagert.

Milzlymphozyten

Nach Tötung der Versuchstiere sowie der Gewinnung von Makrophagen erfolgte die Entnahme der Milzen unter sterilen Bedingungen. Im Anschluss wurden die Organe unter Verwendung eines sterilen Edelstahlgewebesiebes zu einer Einzelzellsuspension aufbereitet. Nach dem Lysieren der Erythrozyten mit NH_4Cl /TRIS-Lösung wurden die restlichen Zellen der Suspension abzentrifugiert, resuspendiert und im Anschluss noch zweimal gewaschen. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 μl Zelllösung in 90 μl Türk'scher Lösung aufgenommen, in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt und auf 1×10^6 Zellen/ml komplettes DMEM-Medium eingestellt. Dabei betrug der Anteil der vitalen Zellen nach Anfärbung mit Trypanblau >95%.

Die Kultur erfolgte in 24-Well-Platten zur Überstandsgewinnung mit jeweils 1 ml Zellsuspension/Well. Die Stimulation erfolgte mit dem Mitogen ConA (2g/ml/ 10^6 Zellen) bzw. PMA (50ng/ml/ 10^6 Zellen) und Ionomycin (0,5ng/ml/ 10^6 Zellen). Anschließend wurden die Milzzellkulturen im Brutschrank für 40 Stunden inkubiert. Zur Überstandsgewinnung wurden die Zellen nach Ablauf dieses Zeitraumes abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, portioniert und bis zur Messung bei -70°C aufbewahrt.

4.2.6. Zytokinbestimmung im ELISA

Der Zytokingehalt der Überstände wurde im Sandwich-ELISA bestimmt. Hierzu wurden 96-Well-Platten (Nunc Maxisorb) mit den in Tabelle 3 angegebenen Primärantikörpern im entsprechenden Beladungspuffer (100 μl /Well) über Nacht bei 4°C beladen. Anschließend werden die Platten gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation der Wells mit 300 μl PBS/3% BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Im nächsten Schritt erfolgt das Auftragen der Proben und Standardverdünnungen im Probenpuffer einzelnen Wells (50 μl /Well).

Nach einer Inkubationsphase über Nacht bei 4°C wurden die Platten gewaschen, danach erfolgte die Detektion durch die in Tabelle 3 genannten biotinylierten Sekundärantikörpern (100 μl /Well) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde in jedes Well der erneut gewaschenen Platte 100 μl Streptavidin-Peroxidase (2 μg /ml in PBS/1% BSA) gegeben und für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Platten erfolgte die Entwicklung der ELISA mit dem Substrat ortho-Phenylendiamin in Zitratpuffer (100 μl /Well). Die enzymatische Reaktion wurde nach ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 2 N H_2SO_4 abgestoppt und die Extinktion im ELISA-Reader gemessen (492 nm/620 nm). Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des jeweiligen

rekombinanten Zytokins mit der in Tabelle 3 angegebenen Anfangskonzentration.

Interleukin-10 und Interleukin-12 wurden mit dem kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Pharmingen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers bestimmt.

Tabelle3: Übersicht über die für die Zytokin-ELISA verwendeten Antikörper, Puffer und Standardkonzentrationen.

Zytokin	Primär-antikörper	Konzentration	Sekundär-antikörper	Konzentration	Standard
IL-1 β	MAB401	2 μ g/ml	BAF401	0,05 μ g/ml	1000 pg/ml
IL-2	JES6-1A12	1 μ g/ml	JES6-5H4	0,05 μ g/ml	2000 pg/ml
IL-4	BVD4-1D11	2 μ g/ml	BVD6-24G2	1 μ g/ml	200 pg/ml
IL-6	MP5-20F3	2 μ g/ml	MP5-32C11	0,25 ng/ml	10000 pg/ml
IFN- γ	R4-6A2	1 μ g/ml	XMG1.2	0,5 μ g/ml	3000 pg/ml
TNF- α	G281-2626	6 μ g/ml	MP6-XT3	0,5 μ g/ml	2500 pg/ml

4.2.7. Bestimmung der Immunglobuline (Ig) und Ig-Subklassen im Serum

Zur Bestimmung der Immunglobuline im Serum wurde ebenfalls die Sandwich-ELISA-Methode angewandt. 96-Well-Platten (hochbindend, Greiner) werden mit 50 μ l Anti-Ig (2 μ g/ml in Blockierungspuffer (BP)), 100 μ l Kollagen I (10 μ g/ml BP), Kollagen II (10 μ g/ml BP), Proteoglykane (10 μ g/ml BP) und mBSA (1,5 μ g/ml BP) beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Platten gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation der Wells mit 100 μ l PBS/3% BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Nach erneutem Waschen wurden 50 μ l oder 100 μ l der Probe sowie der Standardreihe aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach dem Waschen die Zugabe von 100 μ l des Enzym-markierten Antikörpers für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Als Enzyme wurden Peroxidase (PO) und Alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Die überschüssigen Antikörper wurden durch Waschen entfernt und in jedes Well 100 μ l Substratlösung (PO: SOPD oder AP: SpNPP) gefüllt. Die enzymatische Reaktion wurde nach ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 100 μ l/Well 2 N H₂SO₄ für PO oder Stop-Puffer für AP abgestoppt. Die Extinktion wurde für AP bei 405 nm gegen 690 nm oder für PO bei 492 nm gegen 620 nm im ELISA-Reader gemessen. Für die Auswertung wurde eine Standardkurve berechnet und die Konzentration der Proben anhand der gemessenen optischen Dichte berechnet (Tabelle 4).

Tabelle4: Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Bestimmung der Immunglobuline im Serum

Beladung	Standard	Probe	Detektion
Anti-IgG1 (2 µg/ml)	mIgG1	1:40000	Anti-IgG1-AP 1:1000
Anti-IgG2a (2 µg/ml)	mIgG2a	1:5000	Anti-IgG2a-AP 1:500
Anti-IgG2b (2 µg/ml)	mIgG2b	1:20000	Anti-IgG2b-AP 1:1000
mBSA (1,5 µg/ml)	10 µl StdS/ml=1 i.E.	1:500	Anti-IgG-PO 1:2000
Kollagen I	-	1:70	Anti-IgG-PO 1:2000
Kollagen II	-	1:70	Anti-IgG-PO 1:2000
Proteoglykane	-	1:70	Anti-IgG-PO 1:2000

4.2.8. Statistische Auswertung

Die Unterschiede bezüglich der Schwere der Arthritis zwischen den verschiedenen Gruppen wurden mit dem parameterfreien U-Test nach Mann und Whitney geprüft. Die angegebenen Daten zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler vom Mittelwert (standard error of the mean, SEM). Die Signifikanz wurde für folgende p-Werte definiert (Tabelle 5).

Tabelle5: Signifikanz

Signifikanz	p-Wert	Abb.
nicht signifikant (ns)	$p > 0,1$	
bedingt signifikant (ms)	$p \leq 0,1$	(*)
signifikant (s)	$p \leq 0,05$	*
sehr signifikant (ss)	$p \leq 0,01$	**
extrem signifikant (es)	$p \leq 0,001$	***

Zur Bestimmung von Zusammenhängen zwischen den Parametern zur Beurteilung der immunologischen Reaktionen wurde der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (rs) eingesetzt. Die Signifikanz der Korrelation für die verschiedenen Parameter wurde für $p \leq 0,05$ (einseitig) definiert.

Für die Berechnungen wurde das Programm Instat 3.0b for Macintosh, Graphpad Software sowie SPSS 11.0.4. (SPSS Inc., Chicago) eingesetzt.

Die Darstellung der signifikanten Unterschiede erfolgt in den Abbildungen mit Symbolen oder im Text.

5. Ergebnisse

5.1. Einteilung der tierexperimentellen Studien

In der vorliegenden Arbeit sollte die therapeutische Wirkung von lipidmikrosphären-gebundenem Dexamethason (Lipotalon®) im Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus untersucht werden.

Ziel der ersten Therapiestudie war die Ermittlung der therapeutisch relevanten Dosierung von Lipotalon. Hierzu erfolgte die Therapie von jeweils 10 männlichen C57BL/6-Mäusen mit Lipotalon in einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht (KG), 0,25 mg/kg KG und 0,05 mg/kg KG täglich intraperitoneal per injectionem. Eine Kontrollgruppe mit ebenfalls 10 Tieren wurde Natriumchloridlösung verabreicht. Der Behandlungszeitraum erstreckte sich vom Tag der Arthritisauslösung (d0) bis zum Studienende an Tag 19.

Einer weiteren Gruppe wurde Lipotalon in einer Dosierung von 0,5mg/kg Körpergewicht verabreicht, die Behandlung wurde allerdings 10 Tage vor Studienende (d9) abgebrochen, um ein Wiederaufflammen der Entzündung nach vorzeitigem Behandlungsabbruch, das sogenannte Rebound-Phänomen zu beurteilen.

Zur näheren Untersuchung des Reboundeffektes erfolgte die zweite Studie. Zwei Gruppen von jeweils 10 weiblichen C57BL/6-Mäusen wurden Lipotalon in einer Dosierung von 0,5mg/kg Körpergewicht täglich i.p. verabreicht, wobei eine Gruppe über den gesamten Studienzeitraum vom Tag der Arthritisinduktion (d0) bis zum Studienende (d20) und die andere Gruppe bis 14 Tage vor Studienende therapiert wurde. Die Kontrollgruppe erhielt Natriumchloridlösung täglich über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Um einen Einblick in Veränderungen im Verlauf während der Behandlungen zu erlangen, wurden vier kleinere Gruppen (5-6 Tiere) mit 0,5 mg Lipotalon/kg Körpergewicht behandelt und am Tag der Auslösung (d0), d2, d7, d14 und d21 wurde der Einfluss auf die klinische Ausprägung der Arthritis, die Gelenkentzündung und Gelenkdestruktion (Histologie), die Konzentrationen der Antikörper und der IgG-Subklassen im Serum sowie die Zytokinlevel im Serum untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Präparation und Kultur von Peritonealmakrophagen und Milzzellen, um das in vitro sezernierte Zytokinspektrum dieser Zellen erfassen zu können.

Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse der ersten Verlaufsstudie wurde eine weitere

Therapiestudie mit insgesamt neun Gruppen zu je 3-6 weiblichen C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Eine Gruppe wurde am Tag der Arthritisauslösung ausgewertet. Vier Gruppen erhielten Lipotalon in einer Dosierung von 0,5mg/kg Körpergewicht (Therapiegruppen) und vier Gruppen Natriumchloridlösung (Kontrollgruppen) täglich i.p.. Jeweils eine Therapiegruppe und eine Kontrollgruppe wurden an den Tagen d2, d7, d14 und d21 ausgewertet. Dabei wurde wiederum der Einfluss der Glukokortikoidtherapie auf die klinische Ausprägung der Arthritis, die histologischen Gelenkveränderungen, die Konzentrationen der Antikörper, IgG-Subklassen sowie die Zytokinlevel im Serum untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Präparation und Kultur von Peritonealmakrophagen und Milzzellen in vitro.

In einer Vergleichstudie wurde der Behandlungseffekt von Dexamethason-21-palmitat (Lipotalon), ein in Lipidmikrosphären gebundenes Dexamethason, und freiem Dexamethason in der akuten und chronische Phase der Arthritis untersucht.

Dazu wurden jeweils zwei Gruppen mit 5-7 weiblichen C57BL/6-Mäusen mit Lipotalon, mit freiem Dexamethason und mit Natriumchloridlösung (Kontrollgruppen) behandelt. Der Versuch wurde mit je drei unterschiedlich behandelten Gruppen an Tag 2 (akute Phase der Arthritis) und Tag 21 (chronische Phase) beendet.

5.2. Beurteilung der Arthritis

Zur klinischen Beurteilung des Krankheitsbildes der Antigen-induzierten Arthritis wurde die Gelenkschwellung gemessen sowie Gelenkentzündung und Gelenkdestruktion anhand von histologischen Veränderungen der Synovialis und des Gelenkknorpels bewertet.

Ganz allgemein wird die AIA in zwei Phasen gegliedert, die akute Phase (0-7 Tage nach Arthritisinduktion) und in die chronische Phase (8-100 Tage nach Arthritisinduktion).

Dem klinisches Bild der Arthritis entspricht die Gelenkschwellung, die schon einen Tag nach der Arthritisinduktion nachzuweisen ist und nach 3-5 Tagen ihr Maximum erreicht. Die chronische Phase ist durch einen langsamen Rückgang der Schwellung gekennzeichnet, die Gelenkschwellung bleibt aber über Monate nach der Induktion auf niedrigem Niveau erhalten. Ein akuter Entzündungsschub (Flare-up) kann in der späten chronischen Phase durch erneute lokale oder systemische Applikation des Antigens ausgelöst werden und die chronische Entzündung überlagern.

Im Vergleich zu einem gesunden Gelenk ist ein Gelenk in der akuten Phase der Arthritis, durch die akute Synovialitis mit Fibrinexsudation und die Infiltration von Lymphozyten und

Makrophagen in den Gelenkspalt sowie durch die Einsprossung kleinster Gefäße und beginnender Hyperplasie der Synovialmembran gekennzeichnet.

Die entzündliche Aktivität nimmt in der chronisch-destruktiven Phase wieder ab, es kommt zur Chronifizierung der Entzündung mit Hyperplasie der synovialen Deckzellschichten und Infiltration von mononukleären Zellen in das Synovium. Morphologisch stellen sich tiefe Knorpelstrukturdefekte mit eröffneten Chondrozytenlakunen dar. Es entwickelt sich ein invasiver Pannus, der sich auf die Knorpeloberfläche aufgelagert oder subchondral vordringt und zur Erosion des Knorpels und Knochens beiträgt.

5.2.1. Gelenkschwellung

Der Verlauf der Gelenkschwellung wurde durch wiederholte Messungen während des Zeitraumes nach Arthritisinduktion und am Ende der Studie erfasst. Aus der vergleichenden Messung von linkem und rechtem Kniegelenk wurde der Absolutwert der Schwellung ermittelt. Dabei ist ein geringgradiger Fehler in Abhängigkeit von den Fähigkeiten des Untersuchers und durch die individuellen Unterschiede der Gelenke in allen Messungen enthalten.

Dosisfindungsstudie

Bereits am zweiten Tag nach der Auslösung, dem zweiten Behandlungstag, zeigen sich signifikante Gruppenunterschiede bei der Gelenkschwellung (Abb.3). Während die geringste Lipotalon-Dosierung durchweg ohne Wirkung bleibt, ist die Schwellung in den übrigen zwei behandelten Gruppen ab dem zweiten Behandlungstag deutlich vermindert. Dabei werden sogar sehr bis extrem signifikante Unterschiede zwischen Tieren, die mit der höchsten Lipotalon-Dosis behandelt wurden, und der Kontrollgruppe erreicht. Im Verlauf der chronischen Phase kommt es in der Kontrollgruppe zu einem geringgradigen Abfall der Gelenkschwellung, die therapierten Tiergruppen zeigen zu diesen Zeitpunkt Angleichungstendenz an die Werte der Kontrollgruppe.

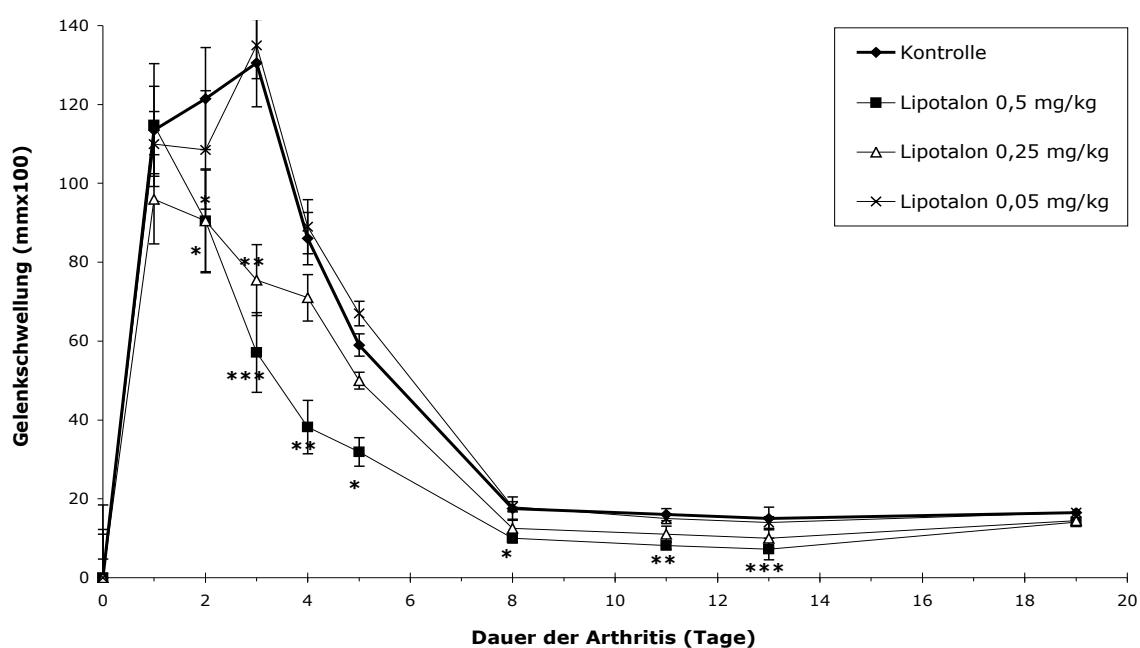


Abb.3: Verlauf der Gelenkschwellung bei unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, ** sehr signifikant, *** extrem signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,25 mg/kg: mit 0,25 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,05 mg/kg: mit 0,05 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

Reboundeffekt

In der akuten Phase der Arthritis liegen die Werte der Gelenkschwellung der therapierten Tiergruppen sehr bis extrem signifikant unter den Kontrollwerten (Abb.4). Ein vorzeitiger Abbruch der Therapie führt zu einem Anstieg der Gelenkschwellung im Verlauf der chronischen Phase und zum Behandlungsende liegt die stärkste Schwellung vor (allerdings ohne Signifikanz), in einer Serie konnte dieser Unterschied nicht gezeigt werden.

Mit einer kontinuierliche Therapie bis zum Behandlungsende werden auch in der chronischen Phase Werte erreicht, die zum Teil sehr bis extrem signifikant unter den Kontrollwerten liegen.

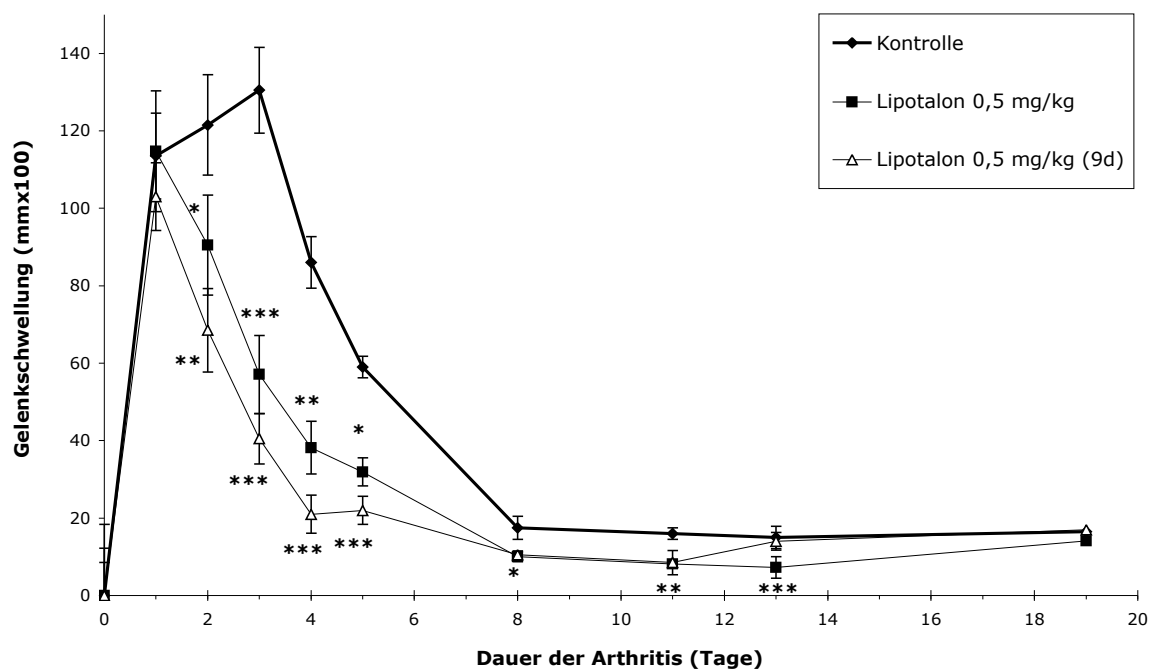


Abb.4: Verlauf der Gelenkschwellung zur Beurteilung des Reboundeffektes, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, ** sehr signifikant, *** extrem signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg; mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,5 mg/kg (9d): mit 0,5 mg/kg Lipotalon bis Tag 9 therapierte Arthritistiere

Vergleich Lipotalon mit freiem Dexamethason

Nach drei Behandlungstagen zeigt sich für beide therapierten Tiergruppen eine gleichwertige deutlich geringere Gelenkschwellung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.5). Im Verlauf der chronischen Phase ergeben sich für die Lipotalon-behandelte Tiergruppe signifikant bis sehr signifikant niedrigere Gelenkschwellungen als für die mit freiem Dexamethason behandelte Tiergruppe. Am Behandlungsende liegt die Gelenkschwellung der mit freiem Dexamethason behandelte Tiergruppe höher als die Kontrollgruppe, wenn auch nicht signifikant.

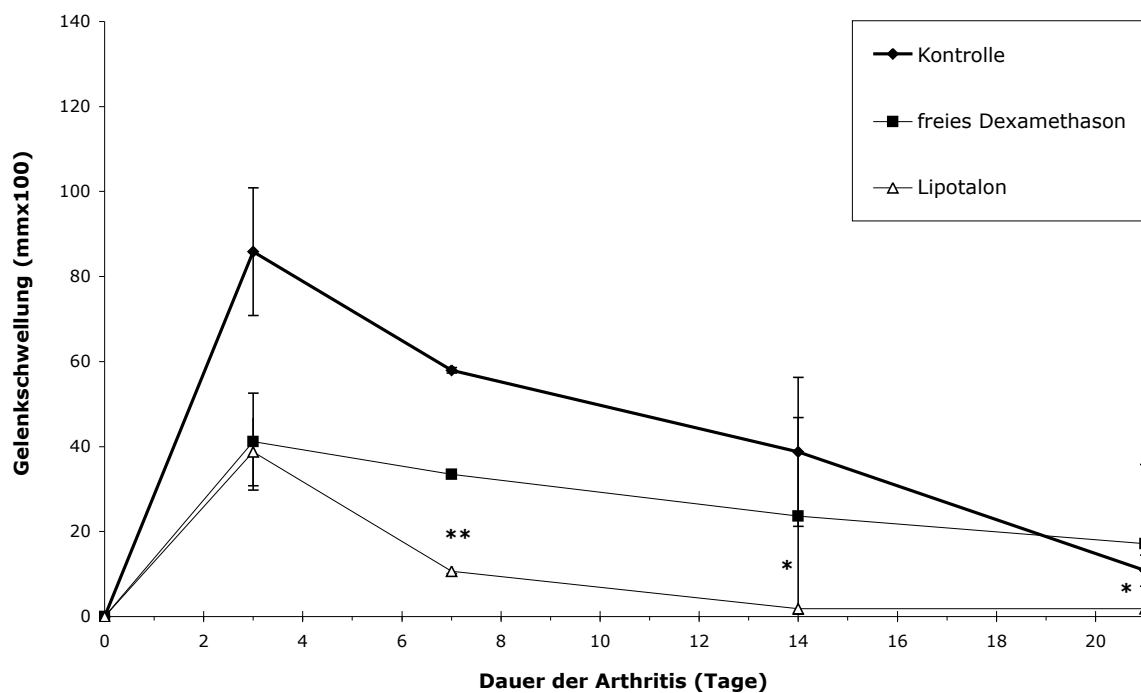


Abb.5: Verlauf der Gelenkschwellung unter Therapie mit Lipotalon im Vergleich zu freiem Dexamethason, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, ** sehr signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, freies Dexamethason: mit 0,5 mg/kg freiem Dexamethason therapierte Arthritistiere, Lipotalon: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

5.2.2. Gelenkentzündung und Gelenkdestruktion

Die Beurteilung der Gelenkentzündung und Gelenkdestruktion anhand von histologischen Veränderungen erfolgte je nach Studiendesign am 2. und 7. Tag nach Arthritisinduktion in der akuten Phase sowie in der chronischen Phase am Tag 14 und entsprechend der Studiendauer vom 19. - 21. Tag.

Die Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht und das zelluläre Infiltrat (Synovialisindex) sowie die Knorpelnekrosen und die Pannusformation (Knorpelindex) wurde semiquantitativ mittels eines histologischen Scores erfasst. Daraus ergibt sich der Gesamtarthritisindex als Maß für den Schweregrad der Arthritis des betreffenden Gelenkes.

Dosisfindungsstudie

Die histologische Beurteilung erfolgte in der chronischen Phase der Arthritis (19 Tage nach Arthritisinduktion) und zeigt eine deutliche Verminderung der Schwere der Gelenkdestruktion mit gleichzeitigem Effekt auf Synovialis und Knorpel unter Behandlung mit Lipotalon (Abb.6). Auf die synovialen Veränderungen nahmen die unterschiedlichen Lipotalon-Dosierungen keinen Einfluss. Ein Effekt ist bei der Beurteilung des Knorpels zu beobachten, je höher die Lipotalon-Dosierung, desto geringer ist die Knorpeldestruktion.

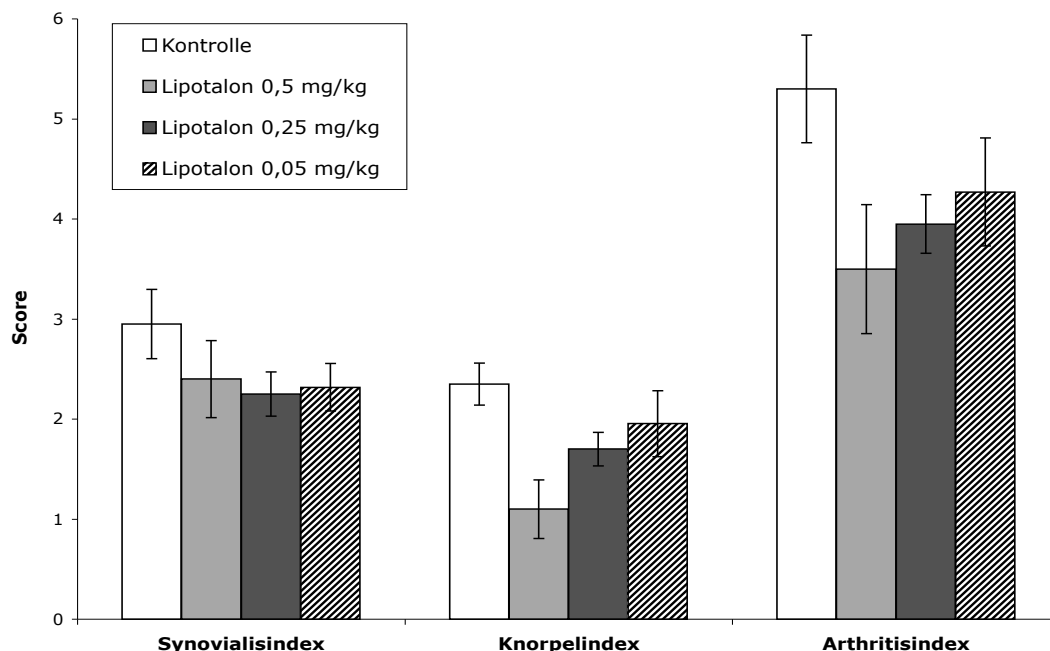


Abb.6: Histologische Veränderungen bei unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,25 mg/kg: mit 0,25 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,05 mg/kg: mit 0,05 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

Reboundeffekt

Entsprechend der Studiendauer von 20 Tagen nach Arthritisinduktion fällt das Studienende in die chronischen Phase der AIA. Die Behandlung mit Lipotalon bis zum Studienende senkt signifikant die histologische Gelenkveränderungen (Abb.7). Gleichmaßen können in Synovialis und Knorpel geringere entzündliche und destruktive Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Durch den vorzeitigen Abbruch der Therapie zeigen sich deutlich stärkere Veränderungen an Synovialis und Knorpel, die sich sogar ausgeprägter als bei der Kontrollgruppe darstellen.

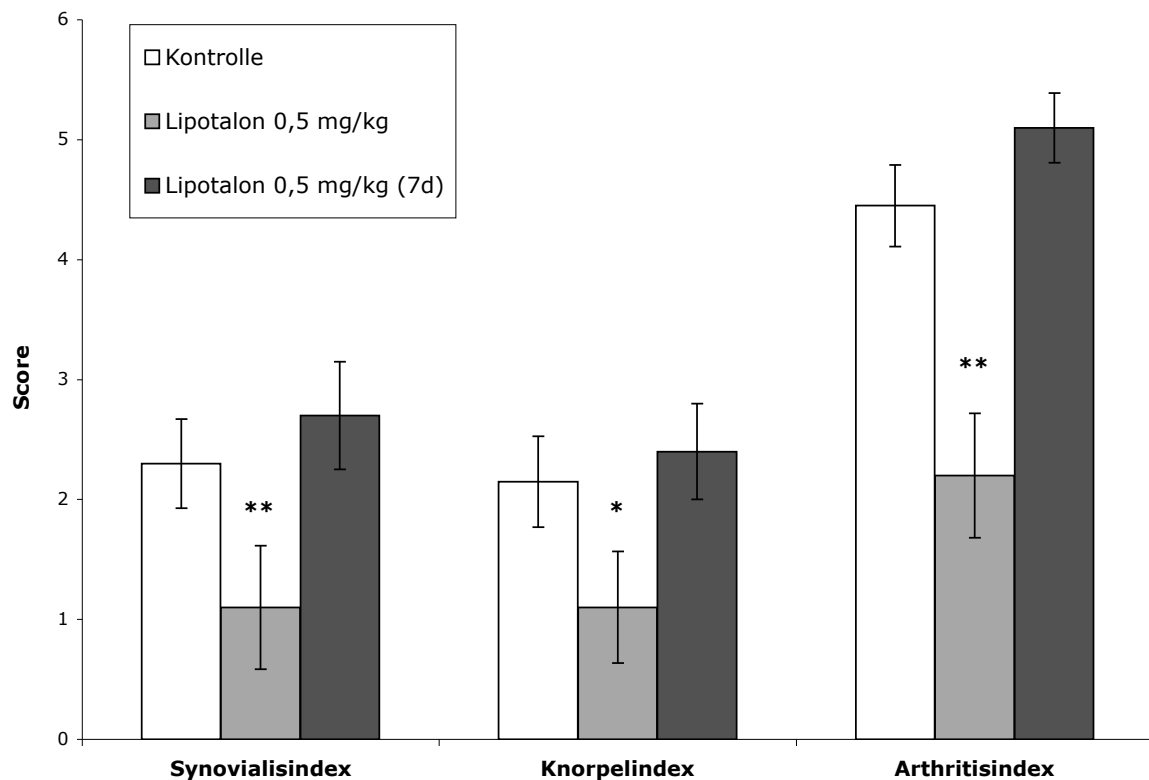


Abb.7: Histologische Veränderungen zur Beurteilung des Reboundeffektes, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, ** sehr signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,5 mg/kg (7d): mit 0,5 mg/kg Lipotalon bis Tag 7 therapierte Arthritistiere

Arthritisverlauf

In der akuten und chronischen Phase sind zu jedem dargestellten Zeitpunkt die entzündlichen und destruktiven Veränderungen der Synovialis und des Gesamtarthritisindex gegenüber der Kontrollgruppe vermindert (Abb.8). Die Knorpelveränderungen sind nur am Tag 7 und Tag 21 weniger ausgeprägt als bei der Kontrollgruppe. Weiterhin ist die Verminderung der entzündlichen Veränderungen der Synovialis mit der Arthritisdauer gut zu erkennen. Diese Abnahme wird bei den therapierten Tiergruppen und in der Kontrollgruppe gefunden, wobei die Abnahme in den therapierten Tiergruppen stärker ist.

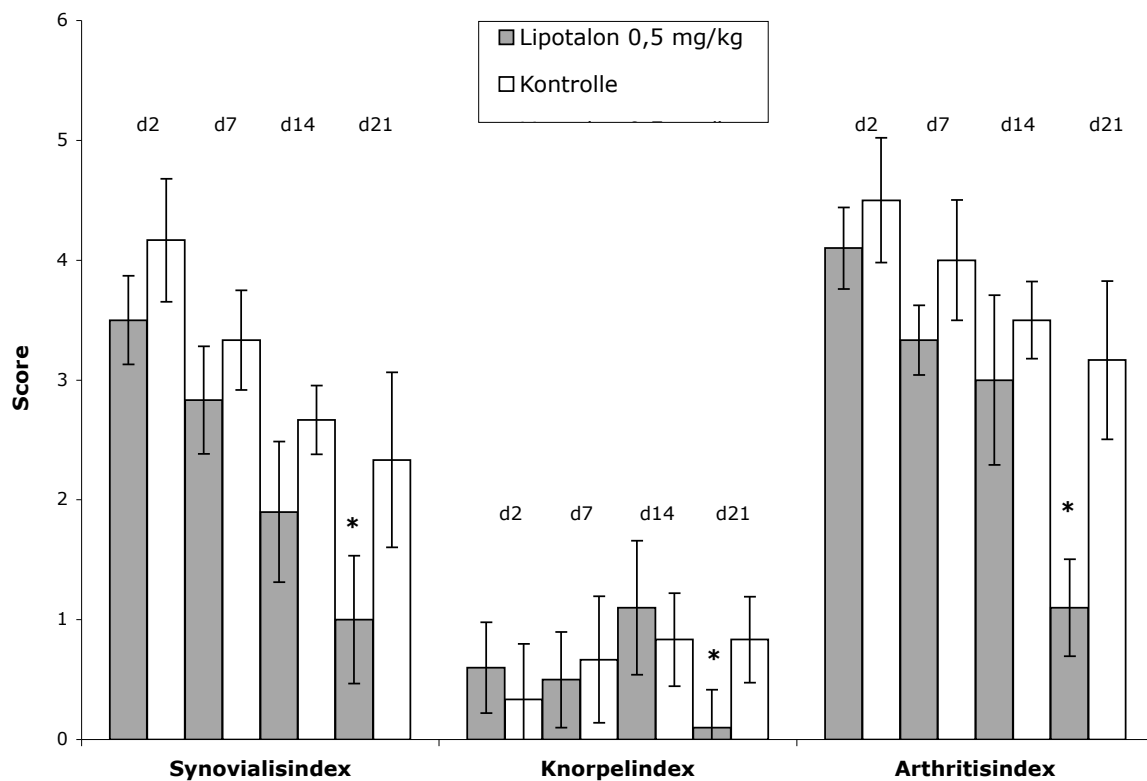


Abb.8: Histologische Veränderungen im Verlauf der AIA, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere; d2, d7, d14, d21: Dauer der Arthritis

Vergleich Lipotalon mit freiem Dexamethason

Auch beim Vergleich der Wirkung von Lipotalon mit freiem Dexamethason zeigt sich eine deutliche Verminderung der Arthritis durch die Behandlung, sowohl die synoviale Deckzellschicht und die entzündlichen Infiltrate, als auch die Knorpelveränderungen betreffend (Abb.9). Dabei ist der Schweregrad der Arthritis bei den Lipotalon-behandelten Tiergruppen noch signifikant bis sehr signifikant niedriger als bei der mit freiem Dexamethason behandelten Tiergruppe.

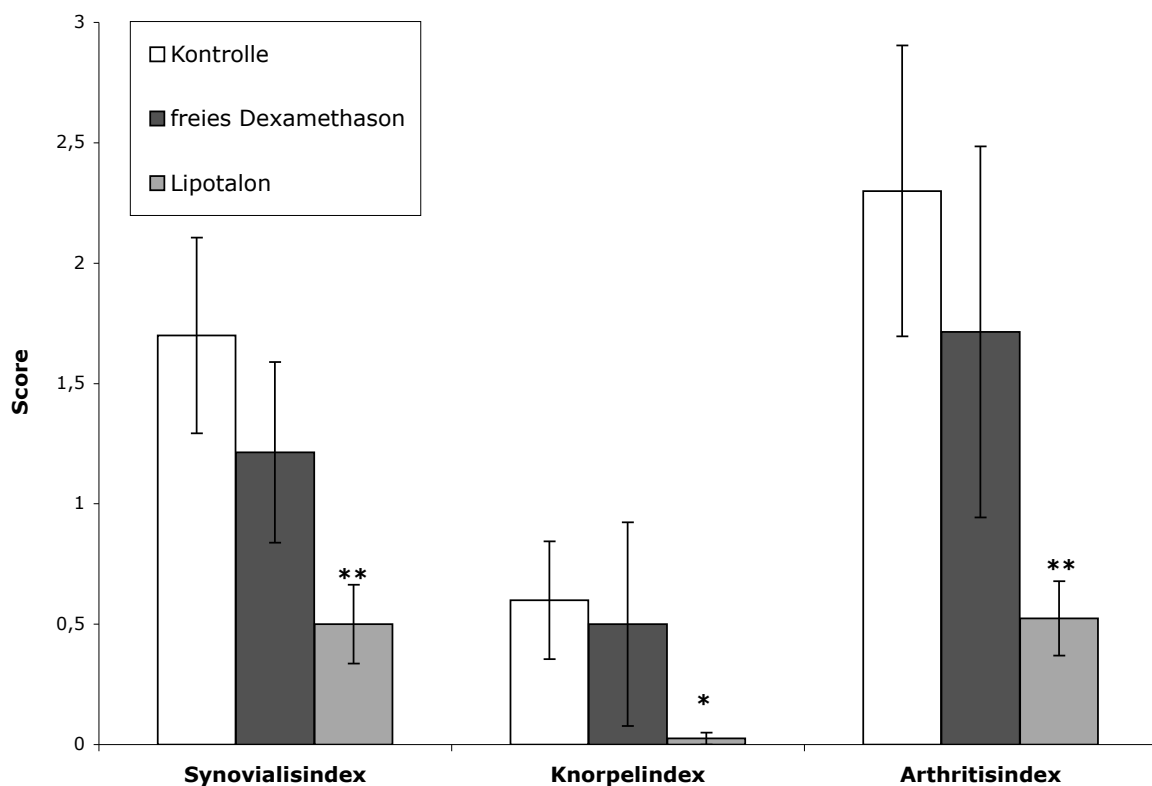


Abb.9: Histologische Veränderungen unter Therapie mit Lipotalon im Vergleich zu freien Dexamethason, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, ** sehr signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, freies Dexamethason: mit 0,5 mg/kg freien Dexamethason therapierte Arthritistiere, Lipotalon: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

5.2.3. Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH)

Die antigenspezifische zelluläre Reaktivität wurde in allen Stämmen in vivo mittels Ohr-Test als verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion durchgeführt. Vor sowie 24 und 48 Stunden nach subcutaner Applikation des zur Induktion der Arthritis verwendeten Antigens mBSA erfolgte die Messung der Ohrdicke, somit konnte für jedes Tier die Ohrschwellung berechnet werden. Die Auslösung der DTH-Reaktion erfolgte immer am Tag 7 nach Arthritisinduktion.

Dosisfindungsstudie

Im Ohr-Test kann eine deutliche dosisabhängige Verminderung der Ohrschwellung festgestellt werden. Die Gruppe der mit 0,5 mg/kg KG Lipotalon therapierten Arthritistiere liegt extrem signifikant unter der Kontrollgruppe, 0,25 mg/kg KG Lipotalon wirken geringer und 0,05 mg/kg KG Lipotalon bleibt ohne Einfluss auf die DTH-Reaktion (Abb.10).

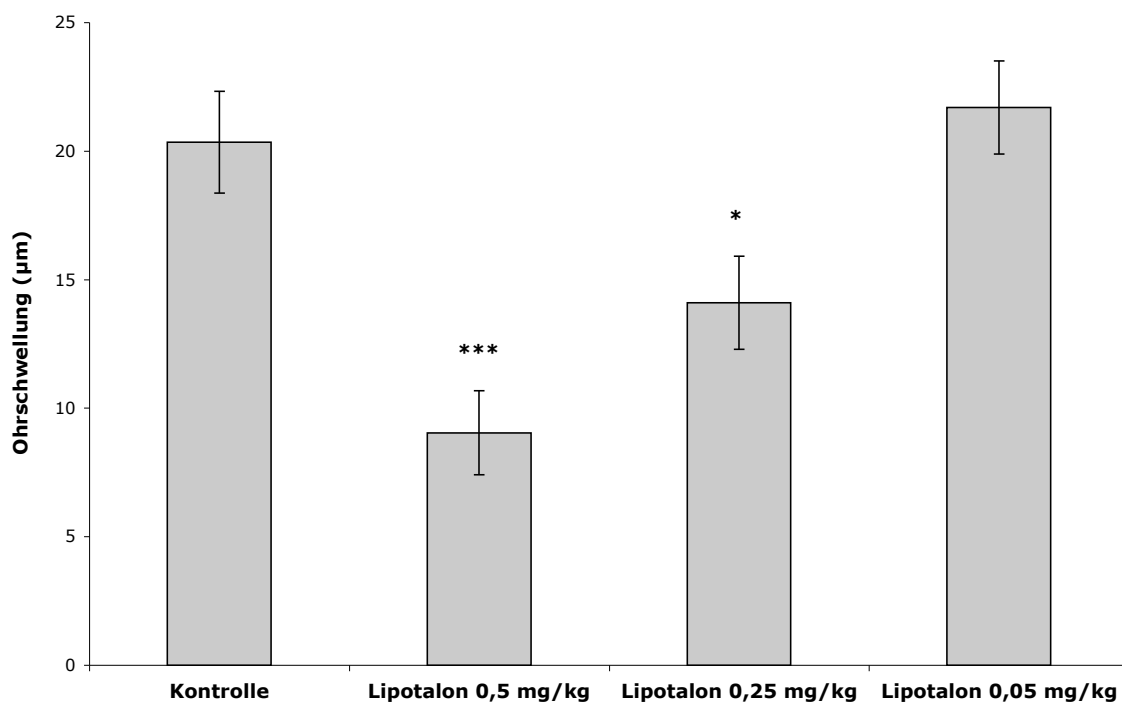


Abb.10: DTH-Reaktion bei unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon; die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, *** extrem signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,25 mg/kg: mit 0,25 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,05 mg/kg: mit 0,05 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

Reboundeffekt

Unter einer kontinuierlichen Therapie mit Lipotalon liegen die Ohrschwellungswerte extrem signifikant unter denen der Kontrollgruppe. Ein vorzeitiger Abbruch der Behandlung am Tag 7 nach Arthritisinduktion führt zu einem Anstieg der Ohrschwellung, dabei bleiben die Werte aber unter denen der Kontrollgruppe (Abb.11).

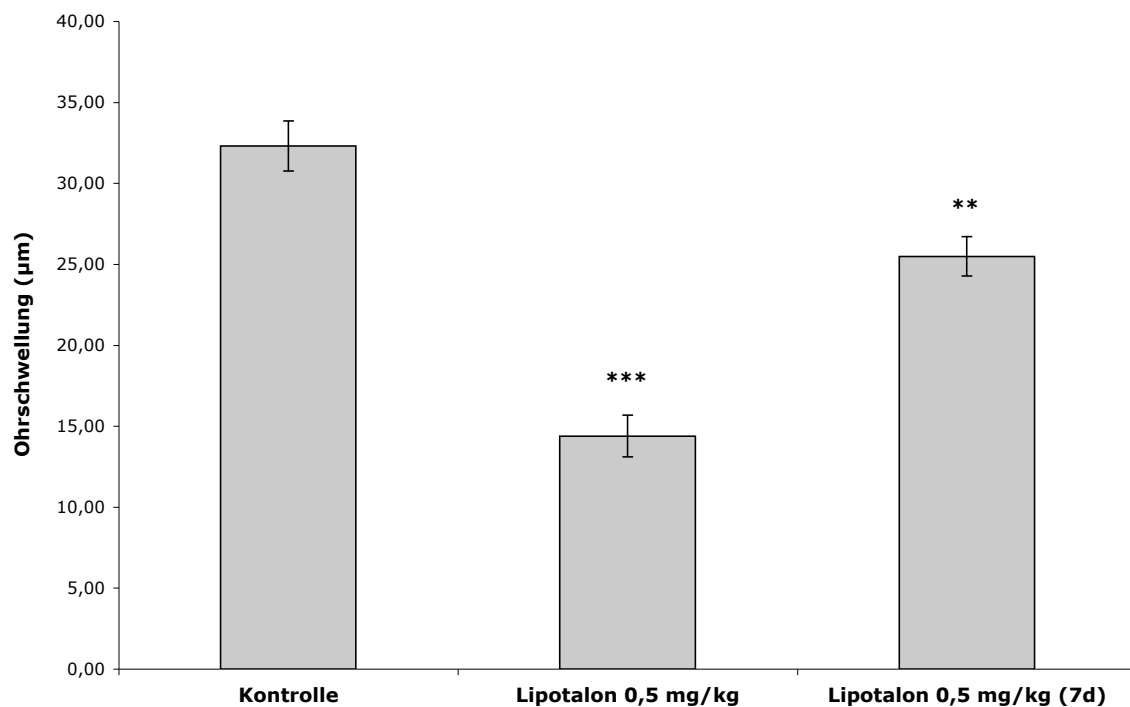


Abb.11: DTH-Reaktion zur Beurteilung des Reboundeffektes, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit ** sehr signifikant, *** extrem signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,5 mg/kg (7d): mit 0,5 mg/kg Lipotalon bis Tag 7 therapierte Arthritistiere

Vergleich Lipotalon mit freiem Dexamethason

In diesem Studienansatz konnten die bereits gefundenen Ergebnisse bestätigt werden, die beiden therapierten Tiergruppen liegen mit ihren Ohrschwellungswerten sehr beziehungsweise extrem signifikant unter denen der Kontrollgruppe. Dabei ergeben sich für die Lipotalon-behandelte Tiergruppe deutlich niedrigere Ohrschwellungen als für die mit freiem Dexamethason behandelte Tiergruppe (Abb.12).

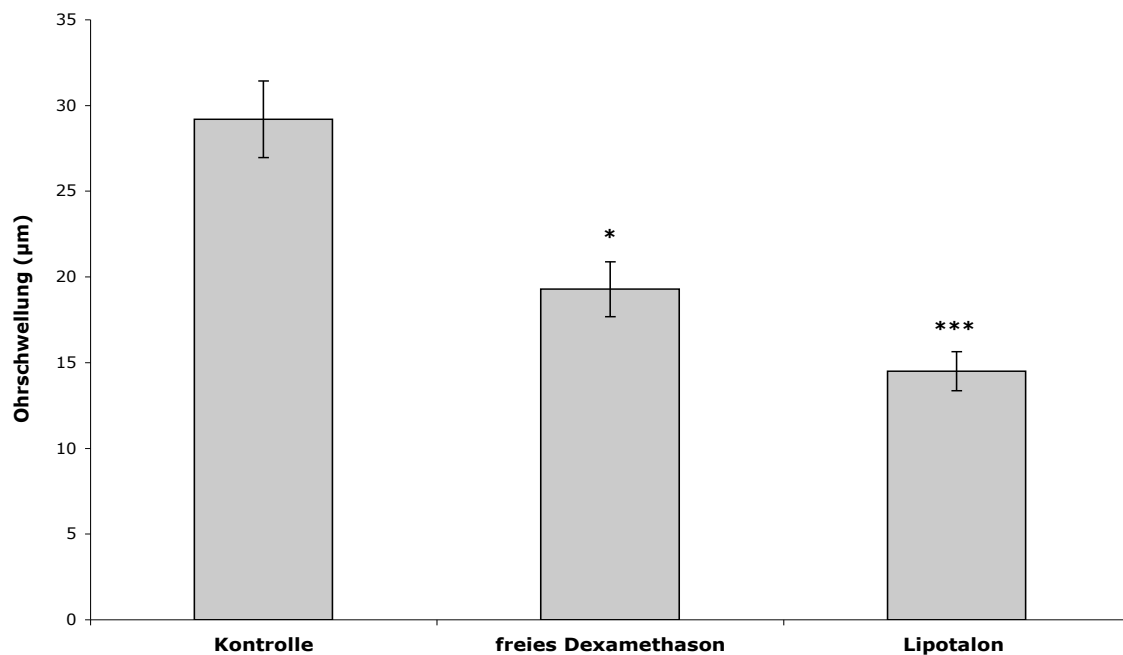


Abb.12: DTH-Reaktion unter Therapie mit Lipotalon im Vergleich zu freiem Dexamethason, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, *** extrem signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, freies Dexamethason: mit 0,5 mg/kg freiem Dexamethason therapierte Arthritistiere, Lipotalon: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

5.2.4. Antikörperbestimmung im Serum

Die Bestimmung der Serumantikörper gegen das für die Arthritisinduktion verwendete methylierte Rinderserumalbumin (mBSA) und gegen die Bindegewebsbestandteile Kollagen Typ I (CI), Kollagen Typ II (CII) und Proteoglykane (PG) erfolgte durch ELISA-Technik.

Dosisfindungsstudie

Die getesteten Serumantikörper unterliegen nur in geringem Maße einer Beeinflussung durch die unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon. Eine geringe Dexamethason-Dosierung bewirkt einen Abfall der mBSA-Antikörper und einen Anstieg des Kollagen I. Die höchste Dexamethason-Dosierung führt zu einem leichten Rückgang des Kollagen II und der Proteoglykane. Insgesamt nähern sich die Werte der behandelten Tiergruppen den der Kontrollgruppe an (Abb.13).

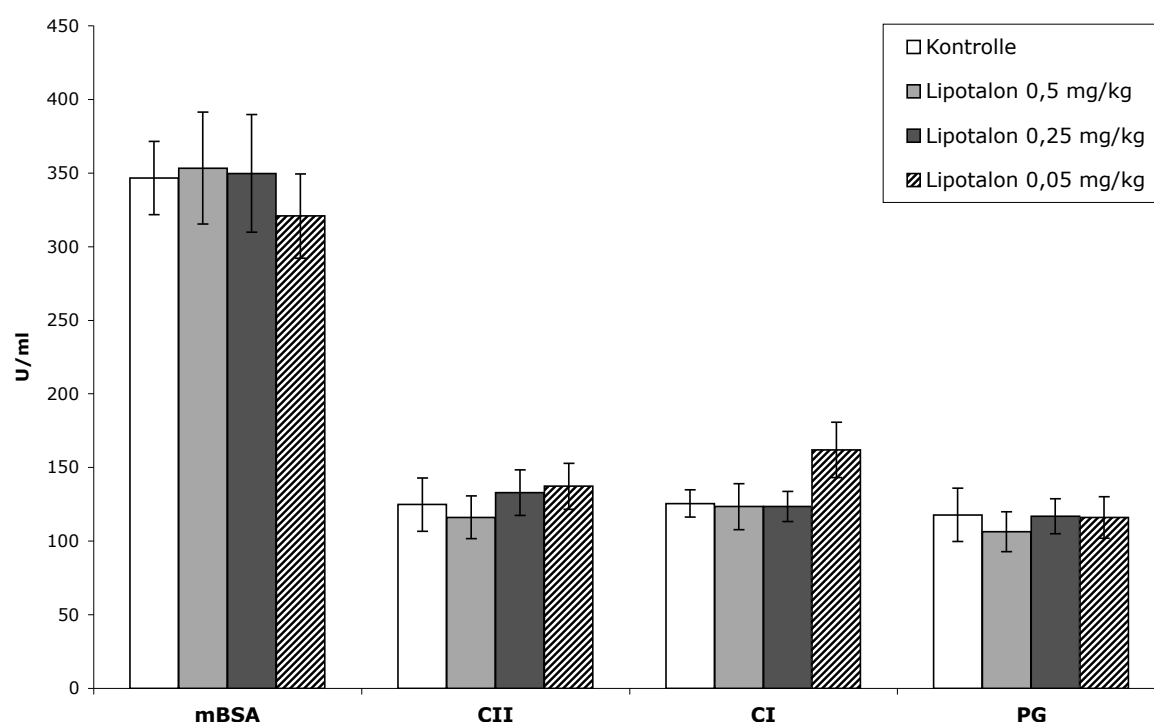


Abb.13: Serumantikörper bei unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,25 mg/kg: mit 0,25 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,05 mg/kg: mit 0,05 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

Reboundeffekt

Die Spiegel der vier bestimmten Serumantikörper zeigen eine einheitliche Gruppenverteilung. Eine kontinuierliche Behandlung mit Lipotalon bis zum Studienende führt zu einem signifikanten Rückgang der Antikörperspiegel von mBSA, Kollagen I, Kollagen II und Proteoglykanen (Abb.14).

Durch den vorzeitigen Abbruch der Therapie kommt es zu einer Annäherung der Werte an die der Kontrollgruppe.

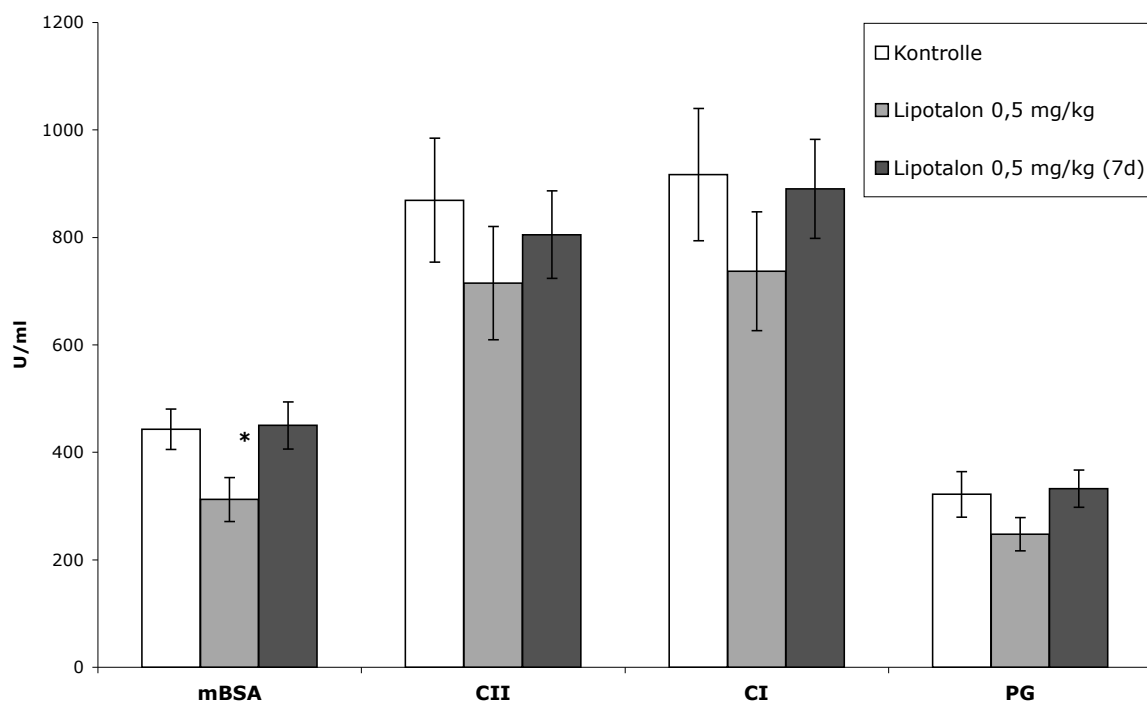


Abb.14: Serumantikörperbestimmung zur Beurteilung des Reboundeffektes, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,5 mg/kg (7d): mit 0,5 mg/kg Lipotalon bis Tag 7 therapierte Arthritistiere

5.2.5. Immunglobuline im Serum

Die Analyse der Immunglobulin-Subklassen ermöglicht Rückschlüsse auf die Th1/Th2-Balance im Verlauf der Arthritis, weil die bevorzugte Bildung der verschiedenen Immunglobulin-Subklassen IgG2a/b (Th1) und IgG1 (Th2) durch Zytokine beeinflusst wird. Um weitere Aussagen über die möglichen Wirkmechanismen auf die Immunreaktivität treffen zu können, wurden diese Subklassen der Immunglobuline in einigen Studien untersucht.

Die Ergebnisse liegen für IgG1 und IgG2a/b als U/ml vor.

Das Verhältnis von IgG2a/IgG1 und IgG2b/IgG1 wurde zur Beurteilung der Polarisierung von Th1/Th2-Zellen errechnet.

Dosisfindungsstudie

Unter hochdosiertem Dexamethason konnte für IgG1 eine signifikante Verminderung im Serum gezeigt werden, während beide anderen Gruppen annähernd Werte der Kontrollgruppe erreichten (Abb.15). Beim IgG2a lagen alle behandelten Gruppen unter der Kontrollgruppe. Ein vergleichbarer Graph wurde für IgG2b erreicht.

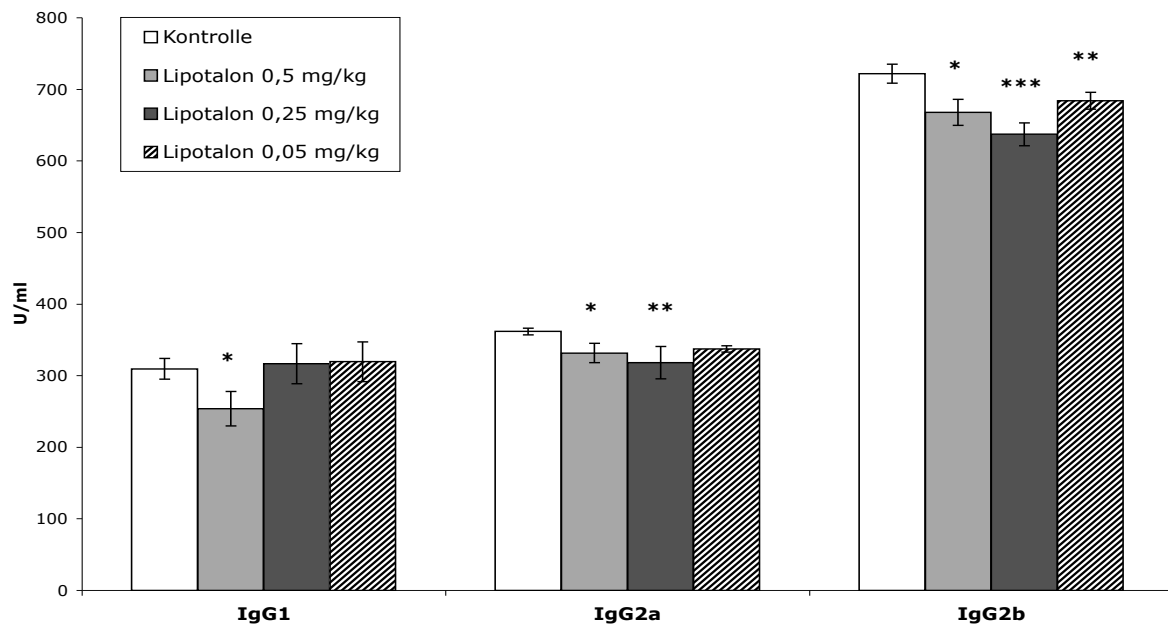


Abb.15: Immunglobulin-Subklassen bei unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon; die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, ** sehr signifikant, *** extrem signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg; mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,25 mg/kg; mit 0,25 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,05 mg/kg; mit 0,05 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

Bei Betrachtung des IgG2a/IgG1- bzw. IgG2b/IgG1-Quotienten ergibt sich eine relative Verschiebung hin zu den Subklassen IgG2a und IgG2b unter Therapie mit 0,5 mg/kg Lipotalon, während sich das Verhältnis bei den beiden niedrigeren Dexamethason-Konzentrationen (0,05 mg/kg und 0,25 mg/kg) hin zu IgG1 verschiebt (Abb.16).

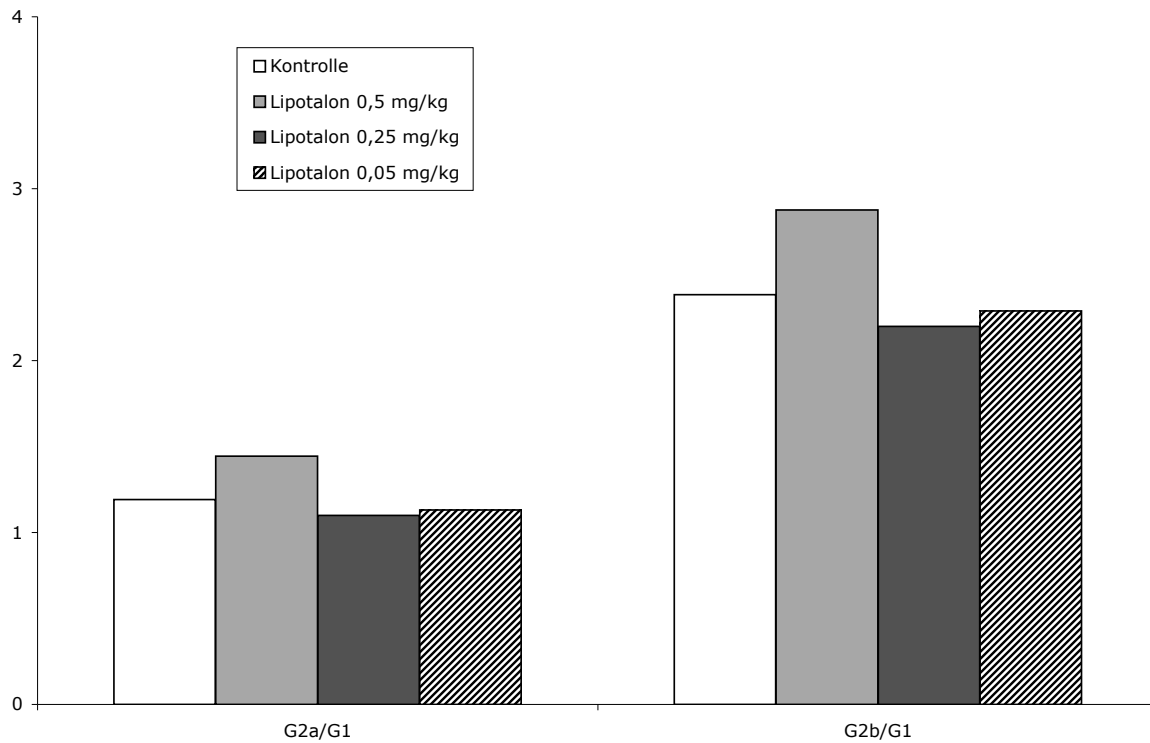


Abb.16: Quotienten der Immunglobulin-Subklassen bei unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,25 mg/kg: mit 0,25 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,05 mg/kg: mit 0,05 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

Reboundeffekt

Während die Konzentration von IgG1 und IgG2b im Serum in beiden behandelten Gruppen deutlich und signifikant niedriger liegen als die Werte der Kontrollgruppe, sind bei IgG2a kaum Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Eine Therapie bis zum Versuchsende senkt signifikant stärker die IgG-Subklassen im Serum, als bei vorzeitiger Beendigung der Therapie (Abb.17).

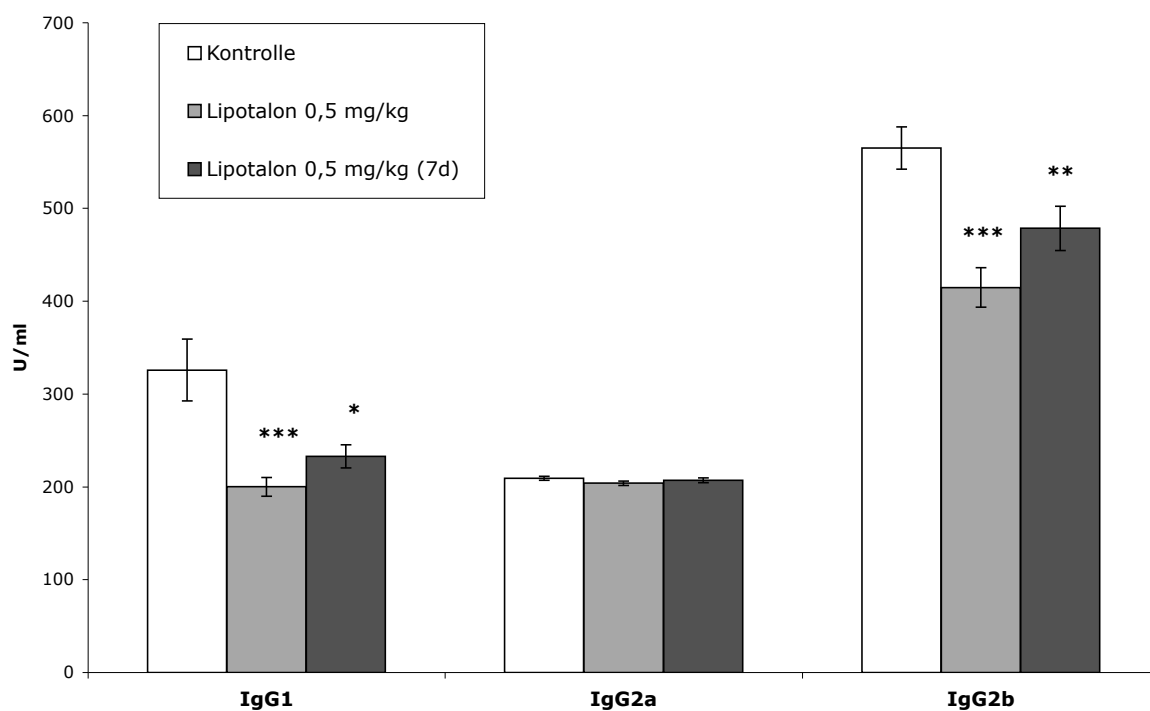


Abb.17: Immunglobulin-Subklassen zur Beurteilung des Reboundeffektes; die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, ** sehr signifikant, *** extrem signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,5 mg/kg (7d): mit 0,5 mg/kg Lipotalon bis Tag 7 therapierte Arthritistiere

Im Rahmen der Untersuchung des Reboundeffektes nach Therapieabbruch an Tag 7 zeigt sich im weiteren Erkrankungsverlauf keine signifikante Veränderung des IgG2a/IgG1- und IgG2b/IgG1-Quotienten (Abb.18).

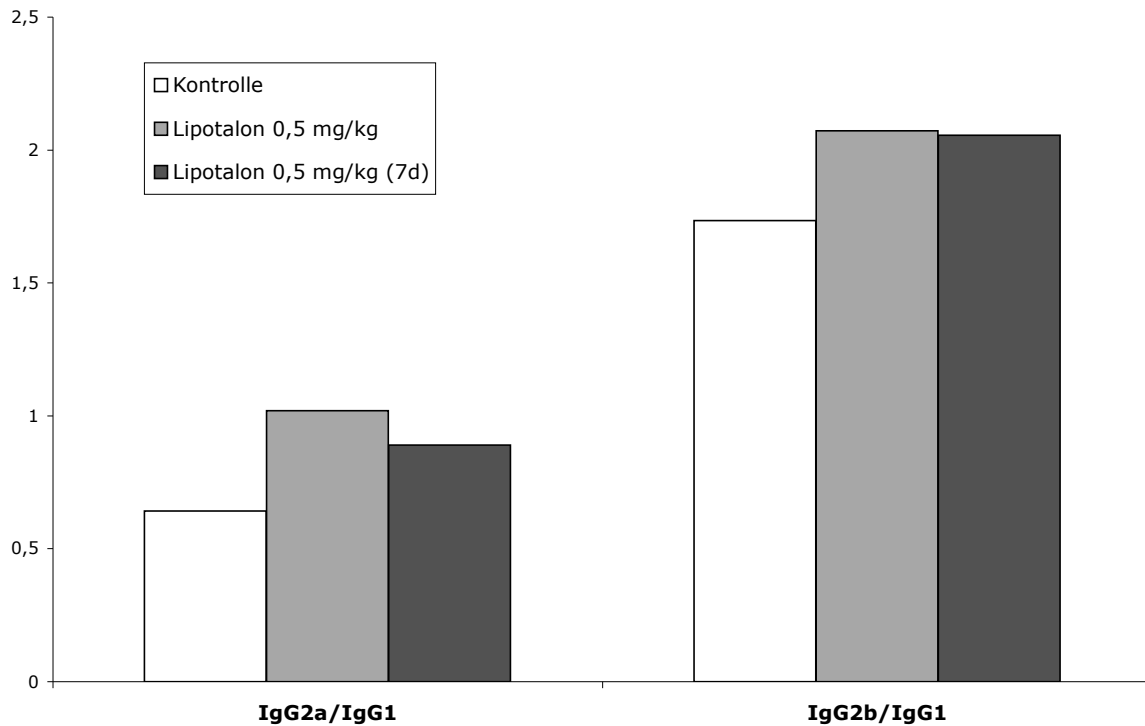


Abb.18: Quotienten der Immunglobulin-Subklassen zur Beurteilung des Reboundeffektes; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg; mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,5 mg/kg (7d): mit 0,5 mg/kg Lipotalon bis Tag 7 therapierte Arthritistiere

5.2.6. Antigen-spezifische Immunglobuline (mBSA-Ig) im Serum

Zusätzlich zur Bestimmung des Gesamtgehaltes der Immunglobulin-Subklassen IgG1 und IgG2a/b wurden die antigen-spezifischen Immunglobulin-Subklassen (mBSA-Ig) von IgG1 und IgG2a/b im Serum bestimmt.

Dosisfindungsstudie

Die Konzentration der antigen-spezifischen Immunglobuline IgG2a und IgG2b im Serum liegt bei den behandelten Gruppen unabhängig der Dosis von Lipotalon annähernd bei der Konzentration der Kontrollgruppe. Für das antigen-spezifische Immunglobulin IgG1 zeigt sich eine signifikante Verminderung der Konzentration unter der höchsten Dosis von Lipotalon (Abb.19).

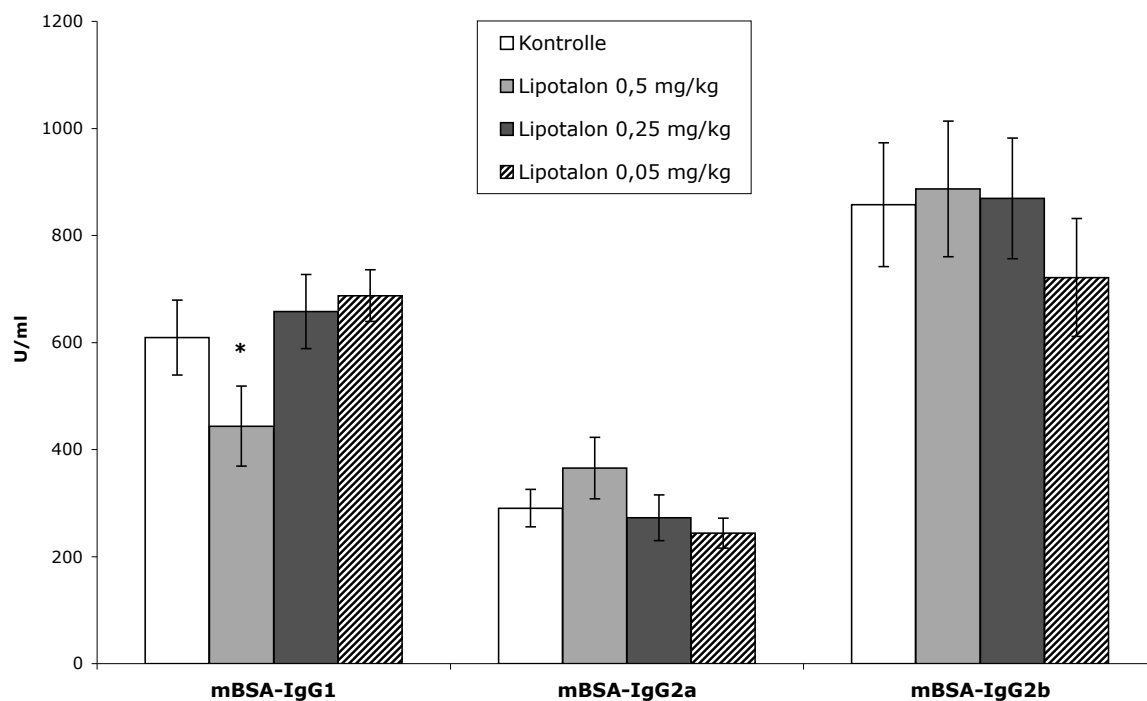


Abb.19: Antigen-spezifische Immunglobulin-Subklassen bei unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon; die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,25 mg/kg: mit 0,25 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,05 mg/kg: mit 0,05 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

Reboundeffekt

Unter der kontinuierlichen Gabe von Lipotalon liegt die Konzentration der antigenspezifischen Immunglobulin-Subklassen (mBSA-Ig) von IgG1 und IgG2a/b im Serum signifikant bis sehr signifikant unter denen der Kontrollgruppe. Durch einen vorzeitigen Abbruch der Therapie am Tag 7 der Arthritis steigt die Konzentration antigenspezifischen Immunglobulin-Subklassen (mBSA-Ig) von IgG1 und IgG2a/b annähernd in den Konzentrationsbereich der Kontrollgruppe (Abb.20).

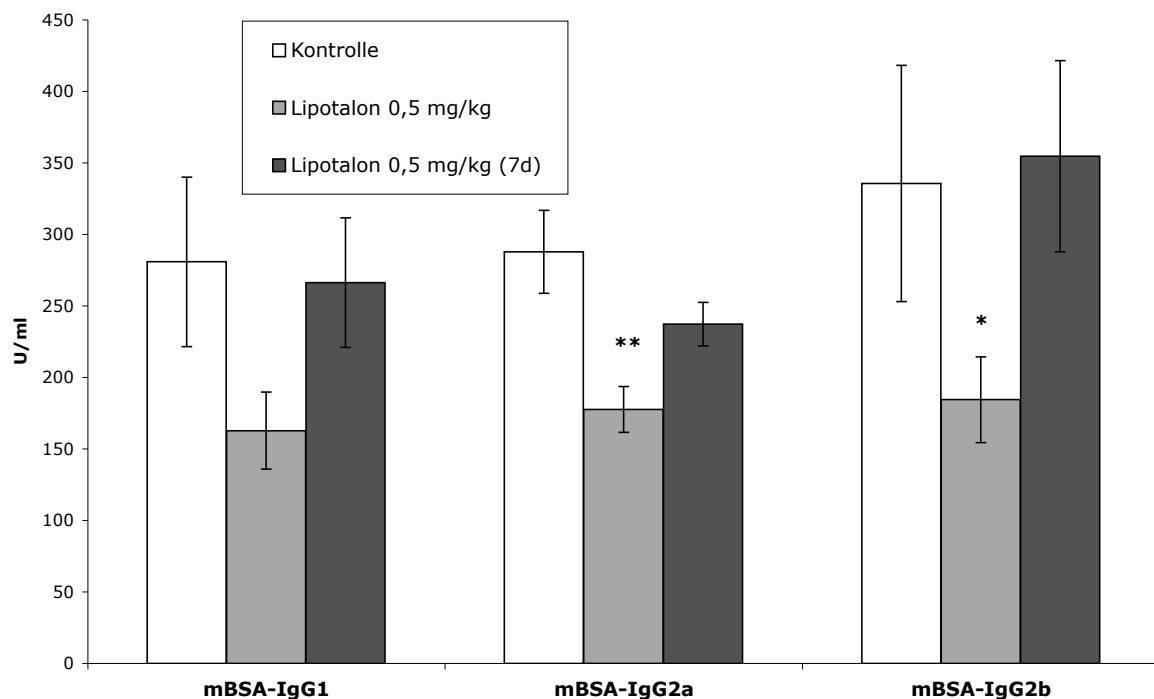


Abb.20: Antigenspezifische Immunglobulin-Subklassen zur Beurteilung des Reboundeffektes, die signifikanten Gruppenunterschiede sind mit * signifikant, ** sehr signifikant dargestellt; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,5 mg/kg (7d): mit 0,5 mg/kg Lipotalon bis Tag 7 therapierte Arthritistiere

5.2.7. Zytokinbestimmung in Makrophagenüberständen

Die Zytokine in gepoolten Makrophagen-Überständen wurden mittels ELISA-Technik bestimmt.

Reboundeffekt

Dargestellt wird der Rebound-Effekt bei vorzeitiger Abbruch der Behandlung am Tag 7 nach Arthritisinduktion im Vergleich zur Behandlung bis zum Therapieende und der Kontrollgruppe.

Unter einer kontinuierlichen Therapie mit Lipotalon liegen die Konzentrationen Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1) in Makrophagen-Überständen unter denen der Kontrollgruppe. Ein vorzeitiger Abbruch der Behandlung am Tag 7 nach Arthritisinduktion führt zu einem Anstieg der Zytokinkonzentrationen (Abb.21).

Die Konzentration von Interleukin-10 (IL-10) lagen unter einer kontinuierlichen Therapie mit Dexamethason sowie bei vorzeitiger Abbruch der Behandlung am Tag 7 nach Arthritisinduktion annähernd im Wertebereich der Kontrollgruppe (Abb.21).

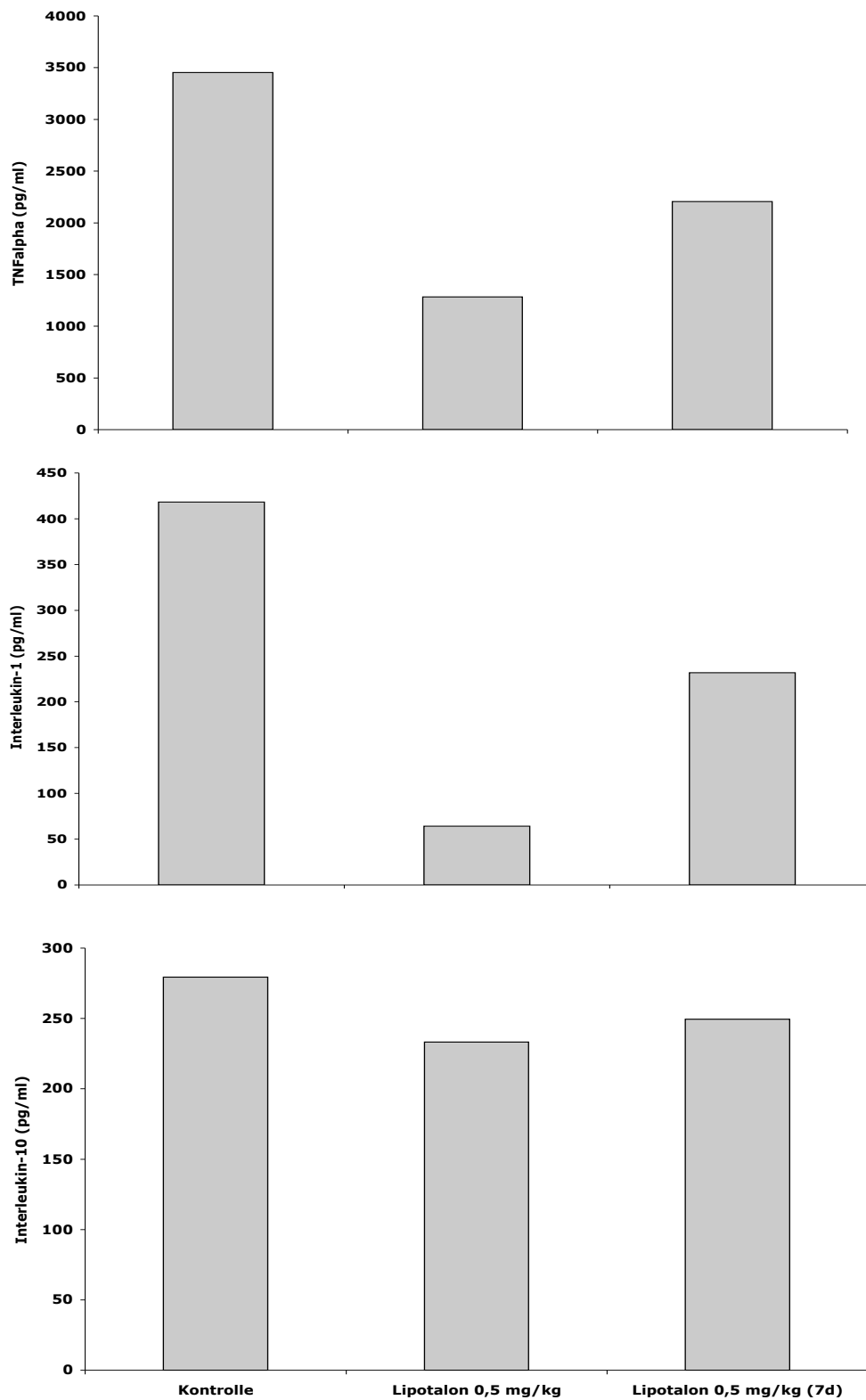


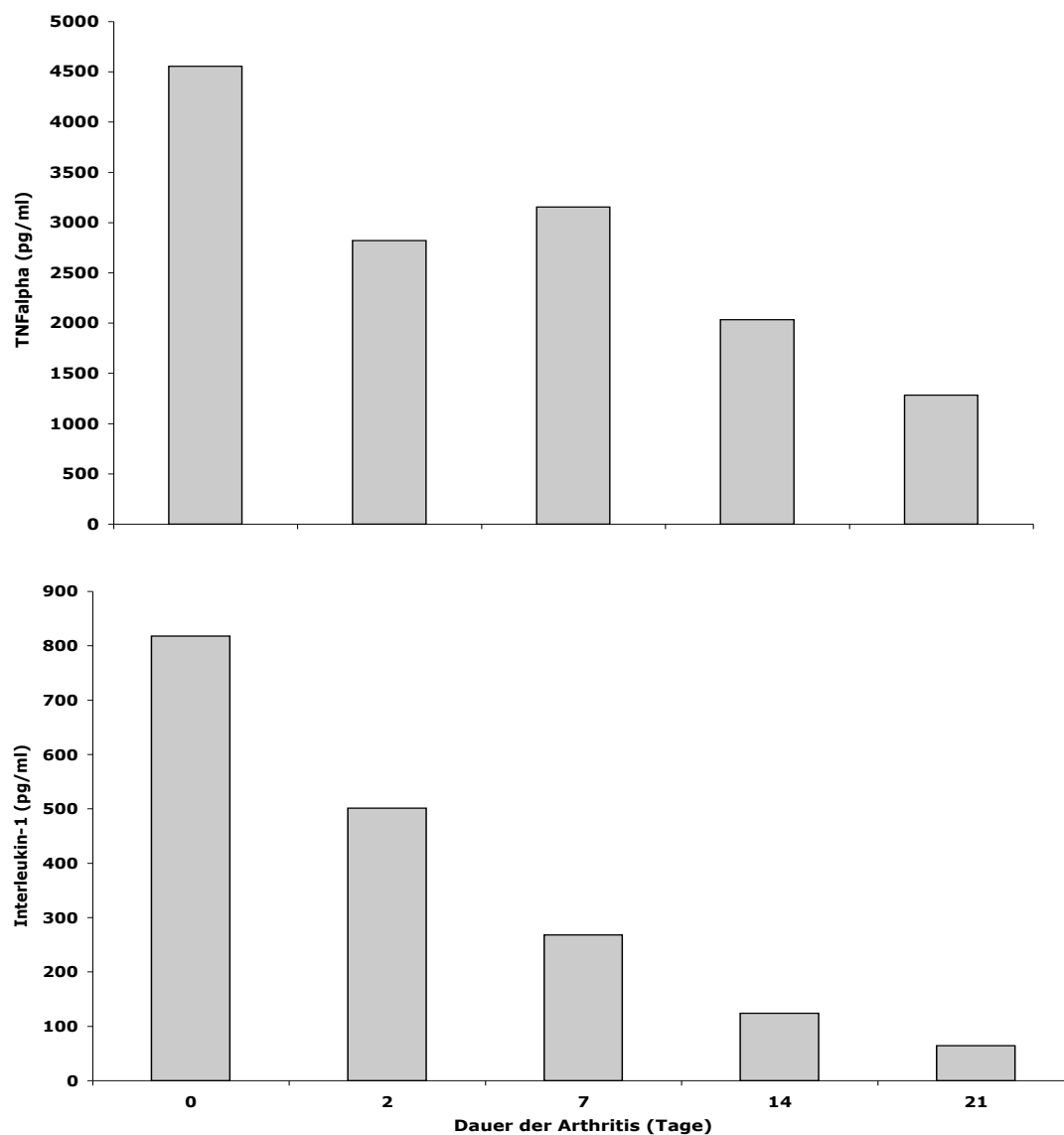
Abb.21: Bestimmung der Zytokine TNF α , IL-1 und IL-10 in Makrophagen-Überständen zum Therapieende in der chronischen Phase der Arthritis unter Behandlung mit Lipotalon; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg; mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere, Lipotalon 0,5 mg/kg (7d): mit 0,5 mg/kg Lipotalon bis Tag 7 therapierte Arthritistiere

Arthritisverlauf

Die Konzentrationen von TNF α und IL-1 in der Makrophagen-Überständen sinkt im Verlauf der Arthritis und erreicht ihren niedrigsten Wert zum Behandlungsende in der chronischen Phase der Arthritis. Für TNF α konnte ein leichter Peak am Tag 7 nachgewiesen werden (Abb.22).

Auch IL-6 liegt in der chronischen Phase der Arthritis in niedrigerer Konzentration als in der akuten Phase vor, ein leichter Anstieg zeigt sich am Tag 7.

Am Tag 2 der Arthritis lässt sich die höchste Konzentration an IL-10 nachweisen, im Verlauf sinkt die Zytokinkonzentration und liegt am Behandlungsende annähernd so hoch wie zum Behandlungsbeginn.



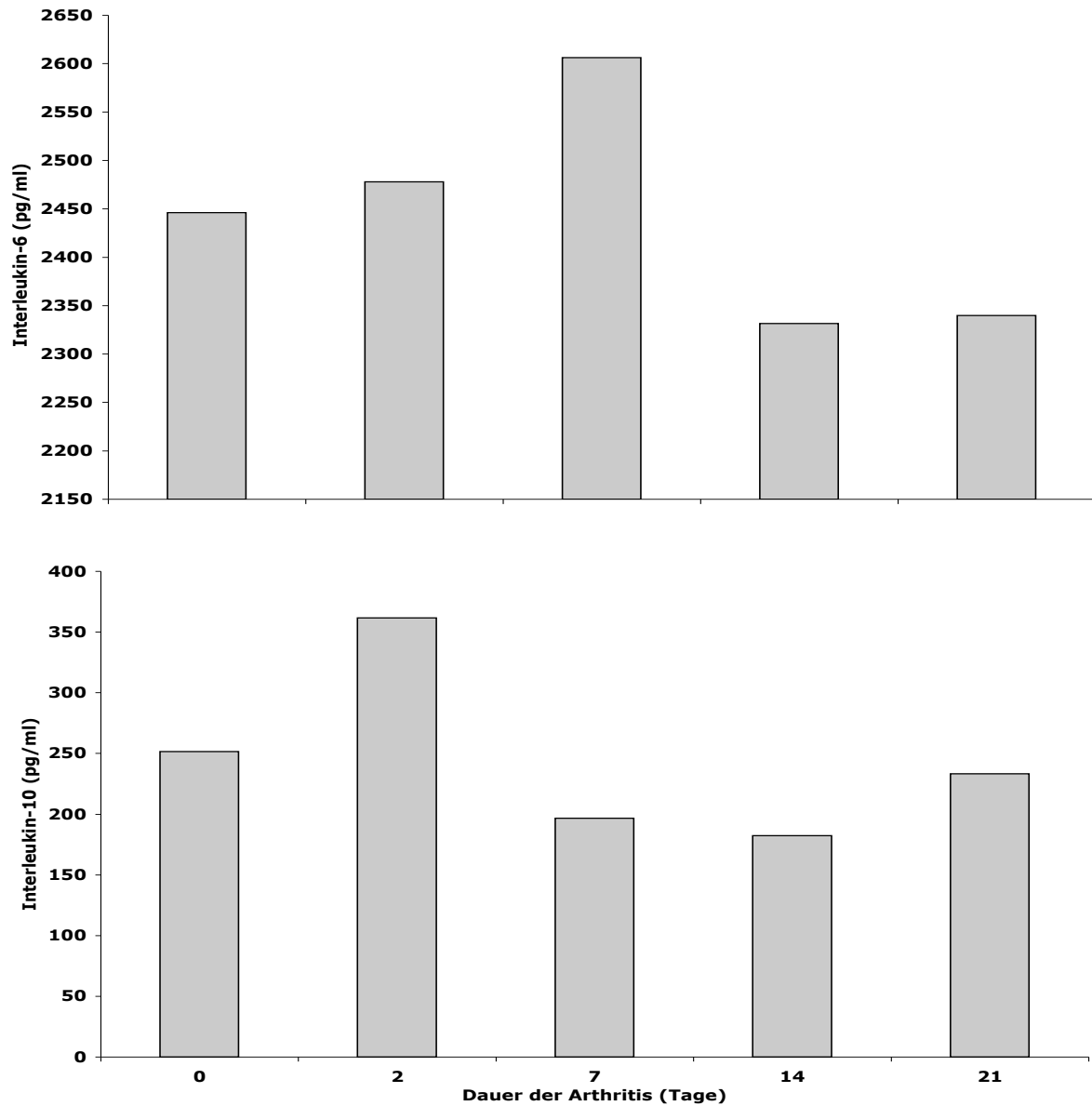


Abb.22: Bestimmung der Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 und IL-10 in Makrophagen-Überständen im Verlauf der Arthritis unter Behandlung mit Lipotalon 0,5 mg/kg KG; 0d, 2d, 7d, 14d, 21d: Dauer der Arthritis

Arthritisverlauf

Die Konzentrationen von TNF α und IL-1 in der Makrophagen-Überständen unter Behandlung von Lipotalon sinkt im Verlauf der Arthritis und erreicht ihren niedrigsten Wert zum Behandlungsende in der chronischen Phase der Arthritis. Für TNF α konnte in der Kontrollgruppe ein leichter Peak am Tag 7 und Tag 21 nachgewiesen werden, während die IL-1-Konzentration der Kontrollgruppe im Arthritisverlauf stetig abnimmt (Abb.23).

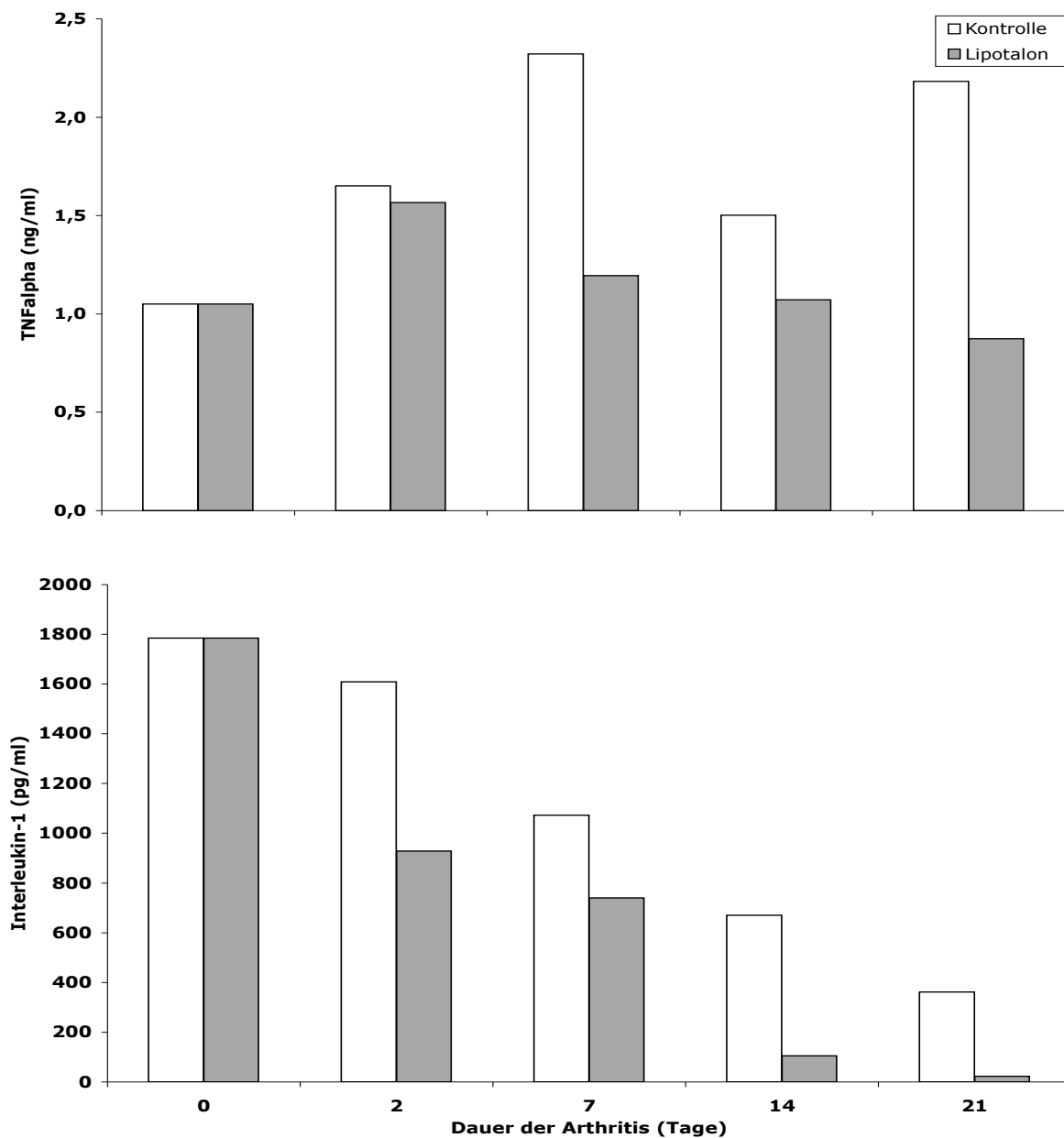


Abb.23: Bestimmung der Zytokine TNF α und IL-1 in Makrophagen-Überständen im Verlauf der Arthritis unter Behandlung mit Lipotalon im Vergleich zur Kontrollgruppe; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg; mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere; d2, d7, d14, d21: Dauer der Arthritis

Vergleich Lipotalon mit freiem Dexamethason

Unter der Behandlung mit freiem Dexamethason als auch mit Lipotalon ließ sich in den Makrophagen-Überständen in der akuten Phase der Arthritis ein Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration nachweisen. In der chronischen Phase lässt sich unter Behandlung mit Dexamethason weniger Tumornekrosefaktor α in den Makrophagen-Überständen bestimmen, dabei ist die $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration unter Lipotalon-Behandlung niedriger (Abb.24).

Durch die Therapie mit Lipotalon ist der Nachweis von IL-1 in Makrophagen-Überständen im Vergleich zur Kontrolle zu beiden geprüften Zeitpunkten im Verlauf der Arthritis deutlich vermindert. Freies Dexamethason bewirkt nur in der chronischen Phase der Arthritis ein leichtes Absinken der Zytokinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle.

Die Bestimmung von IL-12 in Makrophagen-Überständen im Verlauf der Arthritis unter Therapie mit Lipotalon und freiem Dexamethason ergibt in der akuten Phase annähernd gleiche Konzentrationen. Ein deutlicher Konzentrationsabfall zeigt sich in der chronischen Phase der Arthritis (Tag 21) bei beiden behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle.

Ergebnisse

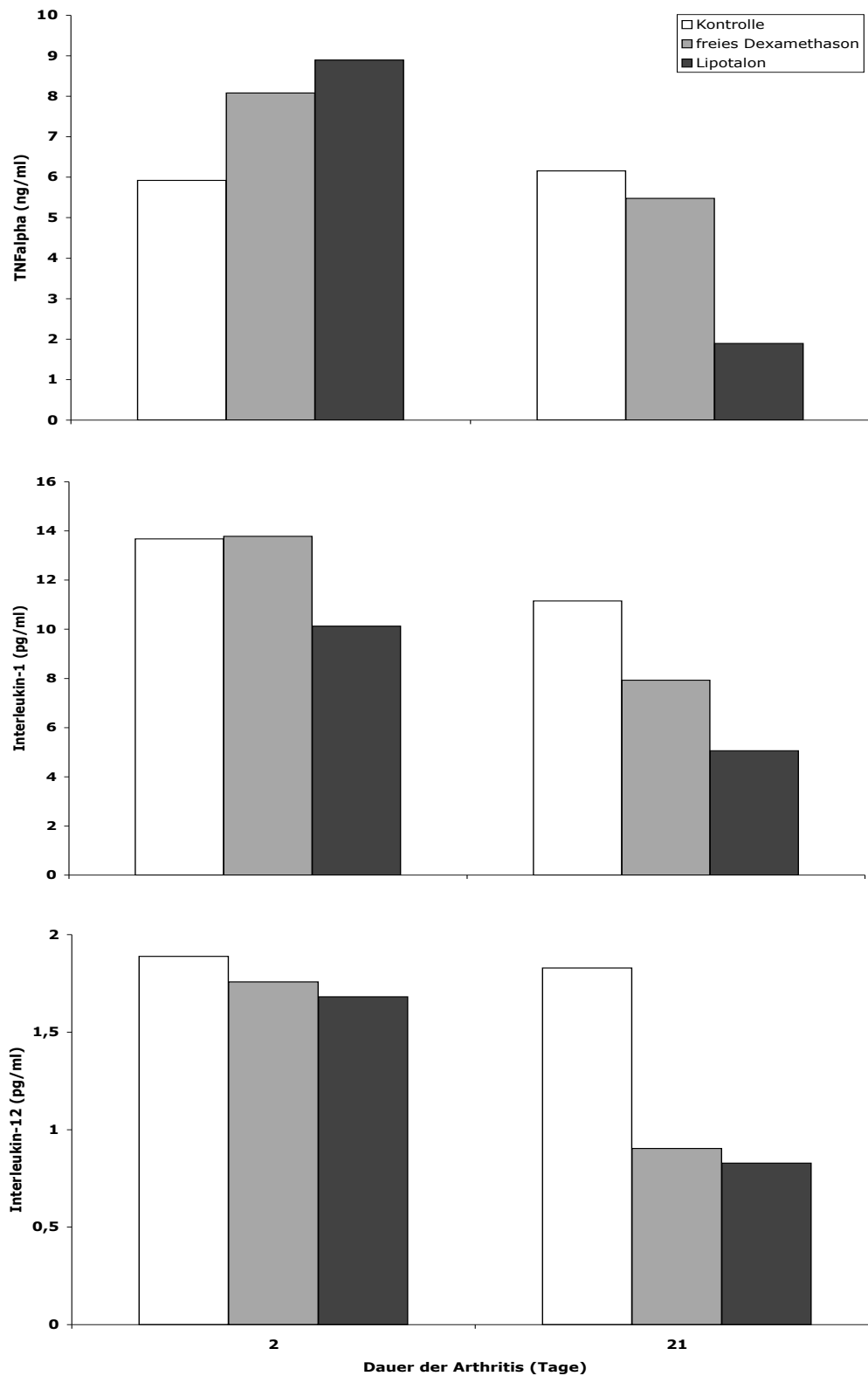


Abb.24: Bestimmung der Zytokine TNF α , IL-1 und IL-12 in Makrophagen-Überständen im Verlauf der Arthritis unter Therapie mit Lipotalon im Vergleich zu freien Dexamethason; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, freies Dexamethason: mit 0,5 mg/kg freien Dexamethason therapierte Arthritistiere, Lipotalon: mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere

5.2.8. Zytokinbestimmung in Milzzell-Überständen

Die Bestimmung der Zytokine Interferon γ (IFN γ), IL-2 und IL-10 in Milzzell-Überständen erfolgte mittels ELISA-Technik. Untersucht wurden ConA-stimulierte Milzzell-Überständen im Verlauf der Arthritis unter Behandlung mit Lipotalon.

Die IFN γ -Konzentration in den Milz-SN liegt bei der Therapiegruppe in der akuten Phase über der der Kontrollgruppe. In der chronischen Phase der Arthritis lässt sich in der Therapiegruppe deutlich weniger IFN γ nachweisen, die Werte liegen unter denen der Kontrolle (Abb.25).

IL-2 ist unter Therapie in geringeren Konzentrationen nachweisbar als in der Kontrollgruppe, nur am Tag 7 liegt die IL-2-Konzentration der Therapiegruppe höher.

Während des gesamten Arthritisverlaufs ließ sich eine höhere IL-10-Konzentration in den Milz-SN unter Behandlung mit Lipotalon im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Abb.25).

Ergebnisse

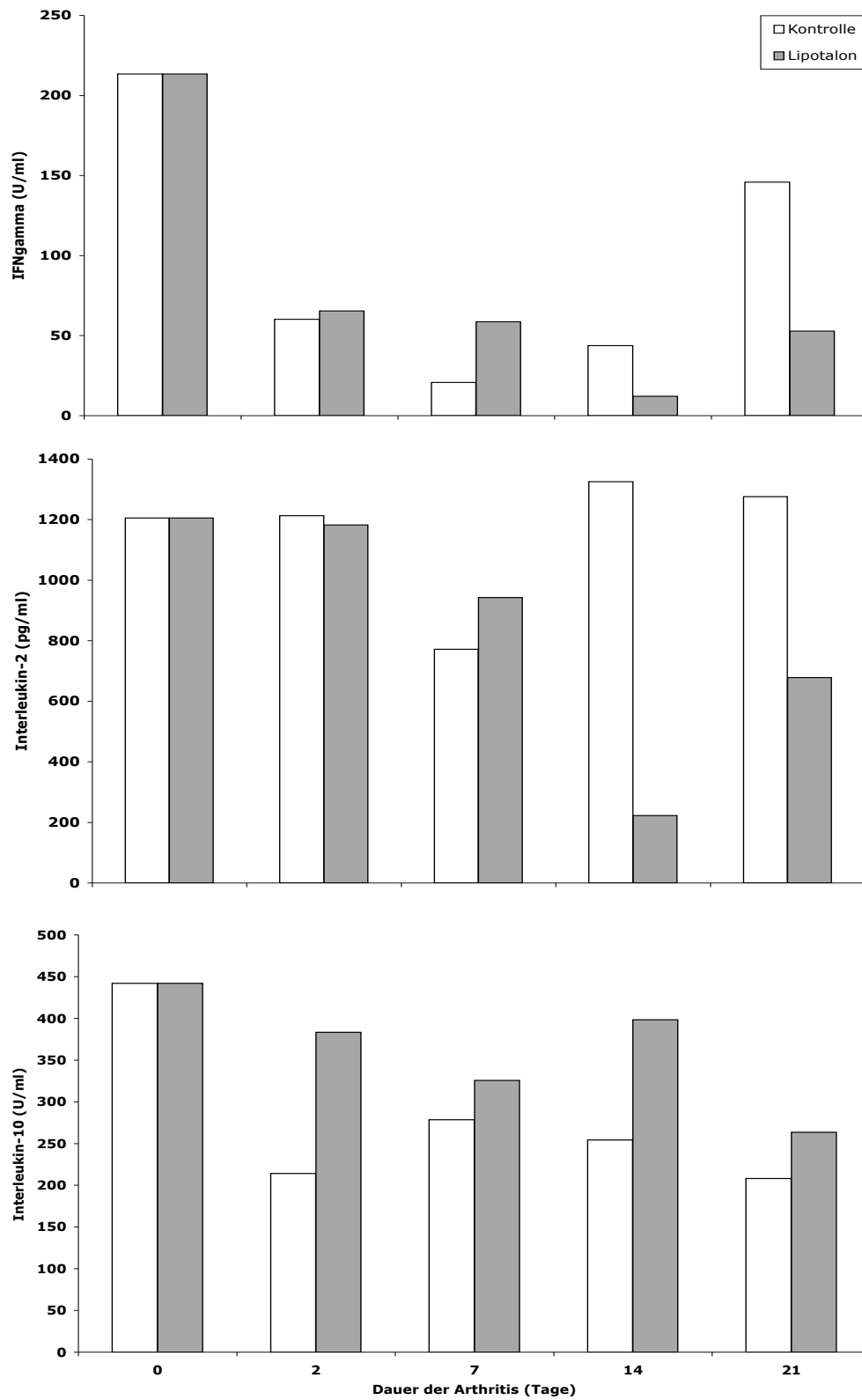


Abb.25: Bestimmung der Zytokine IFN γ , IL-2 und IL-10 in Milzzell-Überständen im Verlauf der Arthritis unter Behandlung mit Lipotalon im Vergleich zur Kontrollgruppe; Kontrolle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Lipotalon 0,5 mg/kg; mit 0,5 mg/kg Lipotalon therapierte Arthritistiere; d2, d7, d14, d21: Dauer der Arthritis

5.2.9. In-vitro-Untersuchungen

Makrophagen

In kultivierten und mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten Peritonealmakrophagen aus Normaltieren, Tieren in der akuten Phase (Tag 7) und chronischen Phase der Arthritis (Tag 21) wurden die Zytokine in den Überständen mittels ELISA-Technik bestimmt.

In vitro lässt sich einen Abfall der Zytokine TNF α , IL-1 und IL-12 dosisabhängig unter Lipotalonbehandlung nachweisen. Der Effekt ist bereits bei sehr niedrigen Dosen (5nMol/l) ausgeprägt. Es tritt also sowohl in Makrophagen aus der akuten wie auch der chronischen Erkrankungsphase eine Senkung der Produktion von TNF α , IL-1 und IL-12 ein (Abb.26).

Ergebnisse

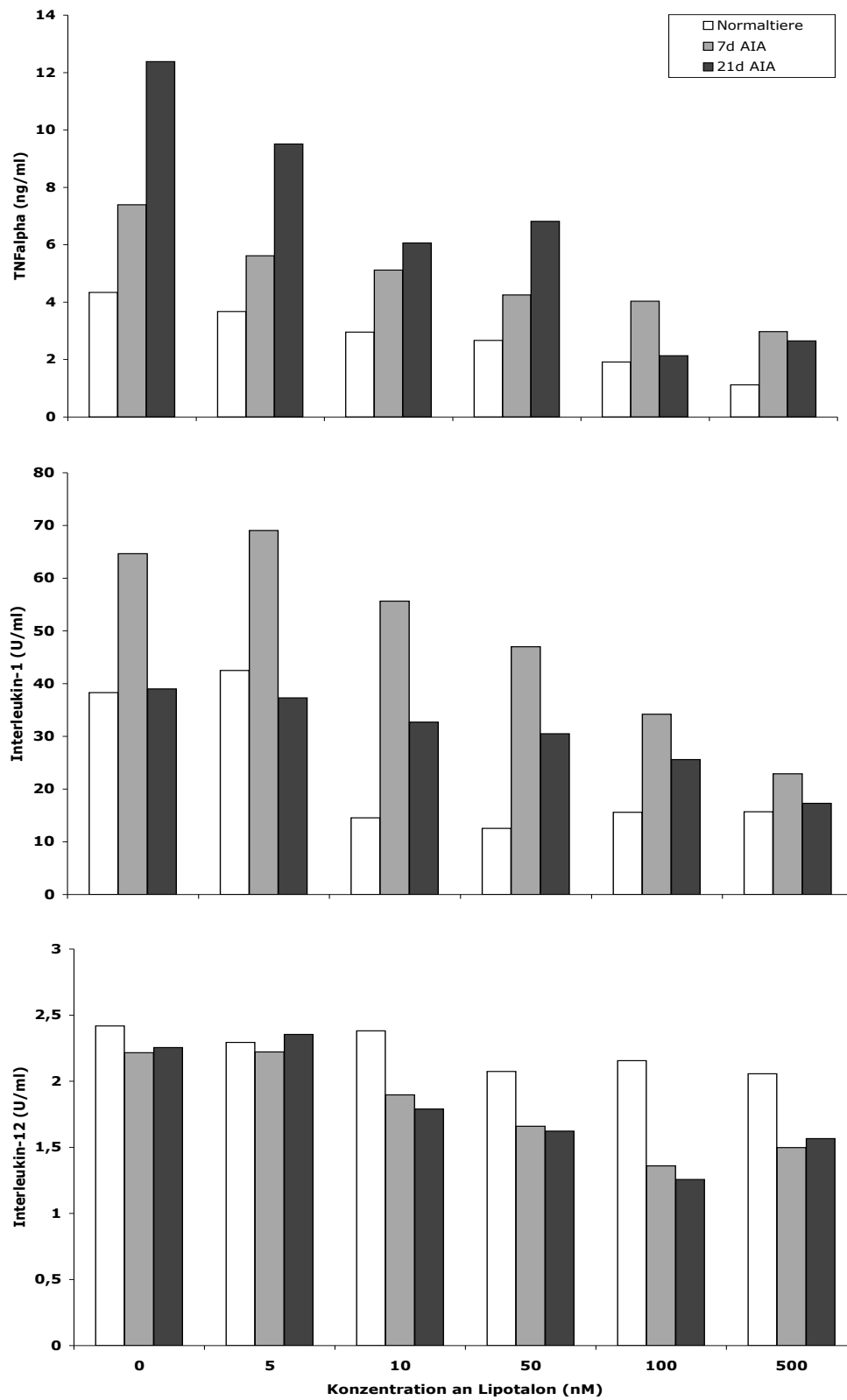


Abb.26: Bestimmung der Zytokine TNF α , IL-1 und IL-12 in kultivierten und mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten Peritonealmakrophagen aus Normaltieren, Tieren in der akuten Phase (Tag 7) und chronischen Phase der Arthritis (Tag 21) unter Therapie mit unterschiedlichen Lipotalon-Konzentrationen

Milzzellen

Milzzellen wurden aus Normaltieren sowie aus arthritischen Mäusen in der akuten Phase (7d nach Auslösung der AIA) und chronischen Phase (21d nach Auslösung der AIA) der Erkrankung gewonnen, in vitro mit ConA stimuliert und der Einfluss verschiedener Konzentrationen an Lipotalon auf die Zytokinproduktion untersucht.

Sowohl bei Lymphozyten aus der akuten wie aus der chronische Phase der Arthritis zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der Produktion an $\text{IFN}\gamma$. IL-4 wurde in der chronischen Phase unter Lipotalon vermehrt nachgewiesen, wobei die höchste Konzentration Lipotalon den stärksten Effekt erzielte. Eine IL-10-Produktion durch die ConA-stimulierten T-Zellen konnte in vitro nicht nachgewiesen werden (Abb.27).

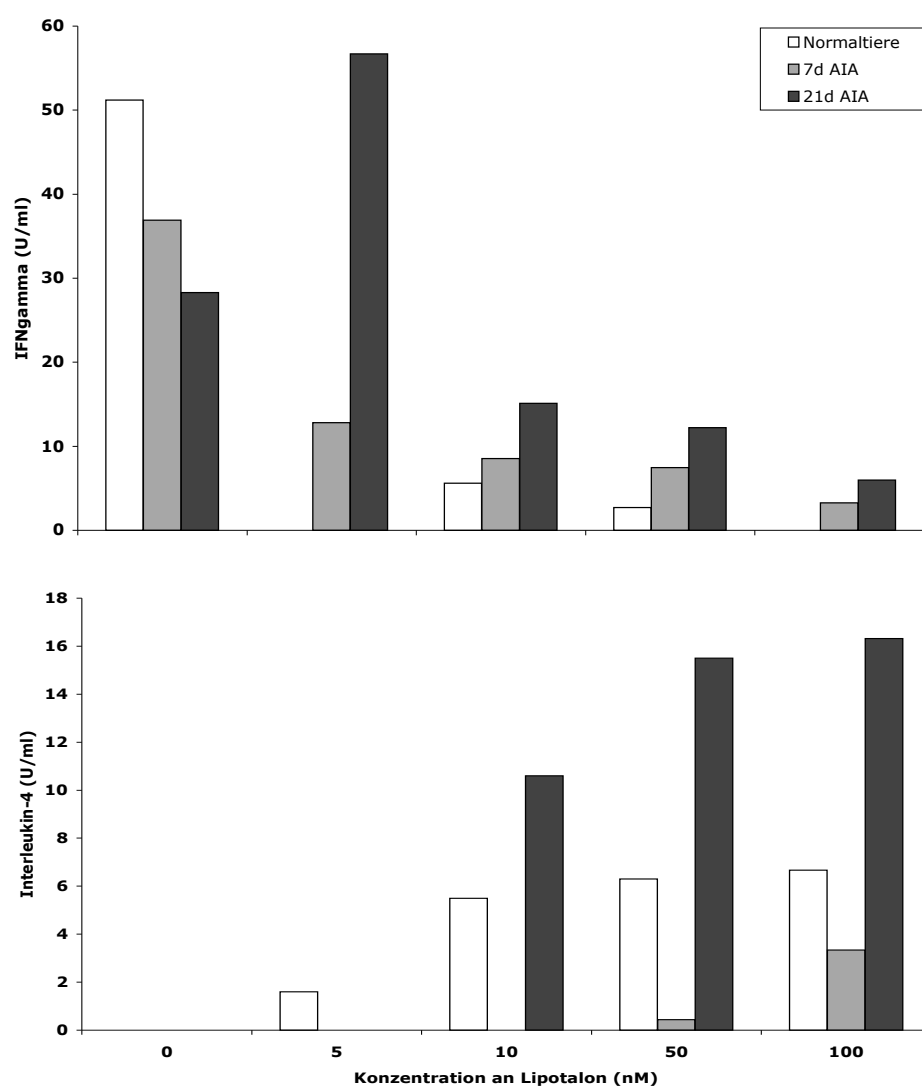


Abb.27: Bestimmung der Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und IL-4 in kultivierten und mit ConA stimulierten Milzzellen aus Normaltieren, Tieren in der akuten Phase (Tag 7) und chronischen Phase der Arthritis (Tag 21) unter Therapie mit unterschiedlichen Lipotalon-Konzentrationen

6. Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-progressive verlaufende Systemerkrankung, die zu destruierenden Entzündungsprozessen an zahlreichen Gelenken führt, begleitet von unterschiedlich ausgeprägten extraartikulären Organmanifestationen. Das ätiopathologische Geschehen der chronischen Gelenkentzündung der RA und die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen sind trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet und zahlreichen interessanten Ergebnissen noch weitgehend unverstanden. Mit fortschreitender Erkrankung kommt es letztlich zur vollständigen Zerstörung der Gelenkstruktur. Die chronischen Entzündungsreaktion in der Synovialmembran induziert die Einwanderung von Monozyten, T- und B- Zellen in das der synovialen Deckschicht unterliegende Stroma (Kim et al., 1999).

Schon sehr früh wurde die Bedeutung der humoralen Immunantwort für die Pathogenese der RA erkannt. Charakteristisch für rheumatische Erkrankungen ist der Rheumafaktor, ein Autoantikörper mit Spezifität für das eigene Immunglobulin (Munthe and Natvig, 1972). Obwohl Rheumafaktoren auch bei anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises auftreten, korreliert nur bei RA-Patienten die Schwere des Krankheitsverlaufes mit hohen Titern.

Auf Grund der therapeutischen Erfolge, die durch die anti-TNF-Therapie erzielt wurden, richtete sich das Forschungsinteresse verstärkt auf Monozyten/Makrophagen und deren Bedeutung für chronische Entzündungsprozesse (Feldmann et al., 1998).

Es gibt eine Reihe von überzeugenden Argumenten dafür, dass aktivierte CD4+ T-Zellen eine zentrale Rolle in der Immunpathogenese der RA einnehmen. CD4+ T-Zellen werden auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet. Sie bestimmen den Verlauf einer spezifischen Immunreaktion durch Regulation der Aktivität anderer Zellen des Immunsystems (Skapenko et al., 2005). Dazu vermitteln sie aktivierende und deaktivierende Signale durch direkten Zell-/Zellkontakt oder Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und unterhalten und fördern so die Immunreaktion. Man kennt heute zwei Gruppen von CD4+ T-Helferzellen, die sogenannten T-Helfer Typ1 (Th1) und Th2-Zellen (Mosmann et al., 1986). Th1- und Th2-Zellen unterscheiden sich auf Grund der von ihnen sezernierten Zytokine und der dadurch vermittelten Effektorfunktionen. Th1-Zellen produzieren den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 sowie die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und Lymphotoxin- α , aktivieren Makrophagen und initiieren daher zelluläre Immunreaktionen. Th2-Zellen produzieren IL-4 und IL-5, vermitteln potente B-Zell-Hilfe und sind daher vor allem an der Initiation humoraler Immunreaktionen beteiligt. Aktivierte Th1- und Th2-Zellen spielen in der

physiologisch-protaktiven Immunantwort ebenso eine Rolle wie bei pathologischen Immunreaktionen. So werden aktivierte Th2-Zellen vor allem bei atopischen Erkrankungen gefunden, während eine Reihe von systemischen Autoimmunerkrankungen durch aktivierte Th1-Zellen charakterisiert werden können (Abbas et al., 1996). Diese Beobachtung stimmt mit der klinischen Erfahrung einer guten Wirksamkeit von T-Zell-spezifischen Therapeutika wie Methotrexat, Ciclosporin, anti-T-Zell-Rezeptor-Antikörper, Anti-TNF α -Antikörper etc. bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen überein. Für verschiedene Tiermodelle von Autoimmunerkrankungen, z.B. die experimentelle allergische Enzephalomyelitis, den insulinabhängigen Diabetes mellitus und die Kollagen-induzierte Arthritis konnte gezeigt werden, dass dabei die Th1-Subpopulation entscheidend für die Ausprägung der pathologischen Immunreaktion ist. Die Beobachtung, dass RA-Patienten signifikant seltener an allergischen Erkrankungen leiden als gesunde Kontrollkollektive weist ebenso auf eine Prädominanz der Th1-Subpopulation in der Pathogenese der RA hin wie die Tatsache, dass die Symptomatik der Erkrankung bei schwangeren Patientinnen sistiert, weil mit der Schwangerschaft ein genereller Switch hin zur Th2-Polarisierung einhergeht (Skapenko et al., 2005).

Glukokortikoide (GC) sind aus dem therapeutischen Repertoire der Rheumatologie nicht wegzudenken. Dank ihres hohen antiinflammatorischen Potentials sind sie unverzichtbar in der Behandlung der meisten entzündlich-rheumatischen Krankheiten. Dennoch wird kaum eine andere Therapie in der Rheumatologie ähnlich kontrovers diskutiert (Conn, 2001; Saag, 2001). Die verbreitete Zurückhaltung im Hinblick auf die Anwendung von GC begründet sich aus den potentiell schweren Nebenwirkungen wie Osteoporose und dadurch bedingte Frakturen, Magengeschwüre, Katarakte, erhöhte Infektanfälligkeit und dem Cushing-Syndrom (Buttgereit, 2003; Saag et al., 1994). Da die Häufigkeit des Auftretens und die Schwere der Nebenwirkungen von der Dosis und Dauer der Therapie abhängen, wurde die Grenzdosis für die Langzeittherapie in den vergangenen Jahrzehnten immer weiter reduziert. Durch Veränderung des Abbauschemas in immer kleinere Reduktionsschritte (1 mg-Schritte) und längeren Intervallen gelingt es häufig, die Erhaltungsdosis im nebenwirkungsarmen Bereich von 5 mg oder weniger Prednisolon/Tag zu bringen. Die hoch dosierte intravenöse Stoßtherapie („pulse therapy“) im akuten Stadium einer Erkrankung und der anschließend rasche Übergang auf niedrigere Dosen hat sich bewährt (Kaiser, 2003). Eine weitere Dosisreduktion kann durch Kombination mit Immunsuppressiva erreicht werden (Rau et al., 2000). Die seit langem bekannte zirkadiane Therapie mit morgendlicher Einmalgabe von Kortikoiden konnte das Risiko einer Nebenniereninsuffizienz deutlich senken. Eine weitere

wichtige Entwicklung bestand in der gezielten Anwendung von GC am Ort des Geschehens, z.B. in der Lunge durch inhalative GC, topische GC zur Anwendung auf der Haut, am Auge oder dem Darm und besonders in der Rheumatologie gebräuchliche intraartikuläre Injektion von Präparaten mit langer Wirkdauer (Buttgereit et al., 2005b). GC sind hoch wirksame Medikamente mit ausgeprägten entzündungshemmenden und immunmodulatorischen Wirkungen, sie hemmen den Zutritt von Leukozyten zum Entzündungsgebiet, interferieren mit Funktionen von Immunzellen und unterdrücken Produktion und Wirkungen von humoralen Entzündungsfaktoren. Diese Wirkungen werden nach dem derzeitigen Erkenntnisstand durch genomische Effekte (Transkription und Translation) und durch nichtgenomische Interaktionen z.B. durch Wechselwirkungen mit biologischen Membranen ausgelöst (Buttgereit et al., 2004; Song et al., 2005). Die Abläufe der klassischen genomischen Wirkung, über die die GC die Synthese von spezifischen Regulatorproteinen beeinflussen, erfolgt durch Anbindung an den zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (cGCR), nachdem das GC-Molekül die Zellmembran penetriert hat. Durch Abspaltung unter anderem von Hitzeschockprotein 90 (heat shock protein 90, HSP 90) kommt es zur Aktivierung des Glukokortikoid/cGCR-Komplexes, der in den Zellkern transloziert wird und dort an DNA-Bindungsstellen, dem sogenannten glucocorticoid responsive elements (GRE) bindet. Die Synthese bestimmter Regulatorproteine (z.B. Annexin) wird induziert, dieser Prozess wird „Transaktivierung“ genannt (Chikanza and Kozaci, 2004; Schacke et al., 2002). Es gibt auch sogenannte „negative GRE“, allerdings wird die Hemmung der Synthese von spezifischen Regulatorproteinen hauptsächlich durch die negative Interferenz des Glukokortikoid/cGCR-Komplexes mit Transkriptionsfaktoren wie NFkappaB (nuclear factor-kappaB) und AP-1 (Activator protein-1) hervorgerufen. Somit hemmen GC z.B. die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α); diese hemmende Wirkung wird als „Transrepression“ bezeichnet (Buttgereit et al., 2004).

Glukokortikoide wirken immunmodulatorisch und bewirken eine Regulierung der Immunfunktion durch Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung der Th2-Zellen. Das zeigt sich unter anderem durch Veränderungen im Zytokinmuster mit Senkung des Levels von TNF α , IL-1 β , IL-6 und INF γ (Cutolo et al., 2006; Neeck et al., 2002; Patten et al., 2004) und Steigerung von IL-4 und IL-10 (DeKruyff et al., 1998; Dozmorov and Miller, 1998).

Für Untersuchungen von Pathogenesemechanismen chronischer Gelenkentzündungen und zur Testung antiinflammatorischer und antirheumatischer Pharmaka wird u.a. die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) der Maus als ein immunologisch induziertes Arthritismodell

eingesetzt. Durch die intraartikuläre Applikation des Antigens kommt es zunächst zu einer Immunkomplexbildung mit Anstoß der Komplementaktivierung und somit zur Ausbildung der sogenannten Arthusreaktion. Die akute Entzündung wird dadurch ausgelöst (Cooke et al., 1983, 1985). Die chronische Phase der Arthritis ist durch synoviale Hyperplasie, Pannusbildung und Destruktion des Gelenkknorpels charakterisiert, histologisch steht ein mononukleäres Infiltrat sowie die Fibroblastenproliferation im Vordergrund (Henzgen et al., 1996). Zahlreiche experimentelle Untersuchungen in den letzten Jahren stellten zunehmend die T-Zellen in den Mittelpunkt der Pathogenese der AIA. Die Arthritisempfindlichkeit kann mittels lymphoider Zellen arthritischer Mäuse auf Tiere mit einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) übertragen werden; dabei wird durch Depletion der CD4⁺ T-Zellen vor der Zellübertragung der Arthritisausbruch verhindert (Petrov et al., 1996a). Verschiedene Therapieansätze mit T-Zell-gerichteten Immunsuppressiva wie beispielsweise Cyclosporin A und Leflunomid (Brauer et al., 1993; Thoss et al., 1996) oder die Behandlung mit Anti-CD4-Antikörpern (Nissler et al., 2004; Pohlers et al., 2004) konnten den Verlauf der AIA mildern.

In der Pathogenese der RA spielen die immunologischen Reaktionen und Entzündungsvorgänge eine große Rolle. Die RA betrifft nicht nur die Gelenke, sondern beweist ihren systemischen Charakter durch unterschiedlich ausgeprägte extraartikuläre Manifestationen. Die AIA eignet sich durch die Ähnlichkeit in der Pathogenese und der therapeutisch-medikamentösen Beeinflussbarkeit als Modell zur Untersuchung der RA.

Untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Lipotalon auf die klinisch-histologischen Veränderungen, die Veränderungen der humoralen Antwort und die Th1/Th2-Balance im Modell der AIA der Maus.

6.1. Klinische und histologische Veränderungen

6.1.1. Therapeutische Wirksamkeit von Lipotalon in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis

In der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis sind Glukokortikoide unverzichtbar, da sie sowohl antiinflammatorisch als auch immunsuppressiv wirken und so einen Basistherapie-Effekt zeigen (Gold et al., 2001). Durch Glukokortikoide wird nicht nur eine Verminderung der akuten Entzündung, sondern auch eine Reduktion der progredienten Gelenkdestruktion erreicht.

In unseren Versuchen bestimmten wir zunächst die therapeutisch relevante Dosis von Lipotalon (Dexamethasonpalmitat in Lipidmikrosphären gebunden) im Modell der Antigen-

induzierten Arthritis der Maus. Zur klinischen Beurteilung der Effektivität der Behandlung diente die Gelenkschwellung. Außerdem wurde die T-Zell-Reaktivität *in vivo* durch Auslösung einer Immunreaktion vom verzögerten Typ (delayed-type hyperreactivity, DTH-Reaktion) auf das spezifische Antigen mBSA bestimmt (Maus-Ohr-Test modifiziert nach (Farmer et al., 1986)).

Ishikaw et al. (2002) konnten zeigen, dass im Modell der CIA der Maus die subkutane Applikation von Dexamethason in einer Dosis von 0,5 mg/kg aller 2 Tage signifikant die Hinterpfotenschwellung und den klinischen Score senkte. Die orale Gabe von Dexamethason (0,1 mg/kg täglich) inhibierte die Pfotenschwellung als klinisches Maß der Entzündungsaktivität in der CIA der Ratte (Takagi et al., 1998). Patten et al. (2004) fanden im Modell der Pristan-induzierten Arthritis (PIA) der Maus eine signifikante Reduktion der klinischen Ausprägung der Arthritis sowie der histologischen Gelenkveränderungen, bestimmt als Arthritisindex, unter oraler Therapie mit 2 mg Prednisolon/kg Körpergewicht.

Im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Ratte konnte eine signifikante Reduktion der klinischen Schwere des Erkrankungsbildes, charakterisiert durch die Hinterpfotenschwellung sowie der histologisch nachweisbaren Knochendestruktionen und Gelenkveränderungen unter Therapie mit 0,1 mg, jedoch nicht mit 0,01 mg Dexamethason/kg Körpergewicht täglich *i.p.* gezeigt werden (Cuzzocrea et al., 2005).

In unseren Untersuchungen zeigte eine Dosis von 0,5 mg/kg Lipotalon, täglich intraperitoneal per *injectionem* appliziert, besonders in der akuten Phase der Arthritis sehr bis extrem signifikante Wirkung auf Gelenkschwellung und DTH-Reaktion. Bereits eine Gabe von 0,25 mg/kg konnte die Gelenk- und Ohrschwellung vermindern. Die niedrigste Dosierung mit 0,05 mg/kg Lipotalon blieb ohne therapeutischen Effekt.

Die histologische Untersuchung der entzündlichen und destruierenden Veränderungen in den Gelenken bestätigt in der Gesamtbeurteilung diese Befunde. Die Veränderungen der Tunica synovialis (Synovialisindex) und des Knorpels (Knorpelindex) wurden bewertet und zu einem Gesamtarthritisindex zusammengefasst. Besonders die Veränderungen des Knorpels wurden durch die unterschiedlichen Lipotalon-Dosierungen stark beeinflusst, die geringster Knorpeldestruktion zeigte sich in unserer Studie bei einer Dosis von 0,5 mg/kg Lipotalon.

Die intraperitoneale Injektion von 0,25 mg/kg Lipotalon führte in einer Studie von Kang et al. (2000) in der CIA der Maus zu einer signifikanten, die Injektion von 0,025 mg/kg Lipotalon hingegen zu einer eher marginalen Reduktion im Arthritisindex. Die Synovitis und die Knorpelerosion wurden durch die täglichen Behandlung mit Dexamethason (0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg und 2,5 mg/kg) dosisabhängig signifikant bis sehr signifikant gemildert (Hunneyball et al., 1986).

6.1.2. Reboundeffekt der klinischen und histologischen Arthritisaktivität nach Absetzen der Therapie

Nach Beendigung einer Behandlung mit Glukokortikoiden zeigten sich in den klinischen Studien immer wieder Exacerbationen der Grunderkrankung im Sinne eines Reboundeffektes. Hickling et al. (1998) stellten fest, dass Prednisolon das Fortschreiten der Gelenkdestruktion in der frühen aktiven Rheumatoiden Arthritis reduziert. Allerdings konnte nach Absetzen von Prednisolon ein Aufflammen der klinischen Symptome beobachtet werden, die Gelenkdestruktion verstärkte sich. Eine Studie bei Patienten mit aktiver Rheumatoider Arthritis über 12 Wochen zum Vergleich der Wirkung von Glukokortikoiden (3 mg/d und 9 mg/d Budesonid und 7,5 mg/d Prednisolon) demonstrierte, dass die klinischen Effekte für Budesonid (9 mg/d) und Prednisolon (7,5 mg/d) mit schneller und signifikanter Reduktion der Symptome ähnlich waren, wie auch die Rebound-Rate nach Absetzen der Glukokortikoide (Kirwan et al., 2004). Selbst bei der topischen Anwendung von Steroiden an der Maus mit chronischer Kontaktallergie zeigt sich nach Behandlungsende ein Reboundphänomen (Tamura et al., 2005).

Auch in unseren Studien konnte ein deutlicher Reboundeffekt nach Beendigung der Lipotalontherapie nach Behandlung der akuten Entzündung beobachtet werden. Ein vorzeitiges Behandlungsende führte zu einem Wiederanstieg der Gelenkentzündung im Verlauf der chronischen Phase der Arthritis, so dass am Behandlungsende die Gelenkschwellungen im Bereich der unbehandelten Kontrollgruppe oder höher lagen. Die Veränderungen an Synovialis und Knorpel sind ausgeprägter als bei der Kontrollgruppe. Auch die Ohrschwellung nimmt bei vorzeitigem Abbruch der Behandlung zu, die Werte bleiben aber unter denen der Kontrollgruppe.

Um ein unerwünschtes Aufflammen der Erkrankung in der klinischen Anwendung von Glukokortikoiden am Menschen zu vermeiden, erfolgt eine schrittweise langsame Reduktion der Tagesdosis bis zum Erreichen einer Erhaltungsdosis. Dieses Ausschleichen nach Beendigung einer Glukokortikoid-Therapie sollte zudem immer engmaschig klinisch kontrolliert werden, um eine erneute Exacerbation der Grunderkrankung zu verhindern (Wagner, 2005).

6.1.3. Vergleich der Wirkung von liposomal gebundenem Dexamethason und freiem Dexamethason

Im nächsten Versuchsansatz untersuchten wir, ob Lipotalon, ein in Lipidmikrosphären gebundenes Dexamethason, durch die gezieltere Wirkstofffreigabe eine höhere Wirksamkeit

im Vergleich zu freiem Dexamethason gleicher Konzentration aufweist. Nach drei Behandlungstagen zeigte sich unter Therapie mit Lipotalon und freiem Dexamethason eine gleichwertige Verminderung der Gelenkschwellung im Vergleich zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf der Arthritis konnte durch die Therapie mit Lipotalon eine signifikante Reduktion der Gelenkschwellung nachgewiesen werden, während durch die Gabe von freiem Dexamethason nur sehr geringe Effekte erzielt wurden. Die DTH-Reaktion wurde durch Lipotalon extrem signifikant gemindert, freies Dexamethason zeigte auch hier bei der Senkung der T-Zell-Reaktivität *in vivo* eine geringere Wirksamkeit. Eine deutliche Verminderung der Arthritis wurde durch die Behandlung mit Dexamethason erreicht, sowohl die synoviale Deckzellschicht und die entzündlichen Infiltrate als auch die Knorpelveränderungen betreffend. Dabei ist der Schweregrad der histologischen Veränderungen unter Therapie mit liposomal gebundenem Dexamethason niedriger als mit freiem Dexamethason.

In einer Studie an Patienten mit Rheumatoide Arthritis erfolgte die systemische Gabe von Dexamethason in Lipidmikrosphären gebunden (Liposteroid) und freiem Dexamethason im Vergleich. Die Ergebnisse zeigen bessere Behandlungsergebnisse mit einer niedrigeren Rate an Nebenwirkungen in der Liposteroidgruppe als unter Therapie mit freiem Dexamethason (Hoshi et al., 1985).

Im Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Ratte konnte durch einmalige i.v.-Applikation von 10 mg Prednisolon pro kg Körpergewicht, gebunden in langzirkulierenden PEG-Liposomen, eine nahezu komplette Remission der klinischen Ausprägung der Erkrankung sowie der histologischen Veränderungen erreicht werden, während eine Therapie mit freiem Prednisolon gleicher Konzentration nur einen marginalen Effekt zeigte (Metselaar et al., 2003). Auch im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Maus konnte eine deutliche Verbesserung der klinischen Entzündungszeichen sowie der histologischen Gelenkveränderungen unter Therapie mit an langzirkulierende PEG-Liposomen gebundenem Prednisolon im Vergleich mit freiem Prednisolon erzielt werden. In der gleichen Studie wurde auch gezeigt, dass eine Anreicherung der PEG-Liposomen nur im entzündeten Gelenk stattfand (Metselaar et al., 2004).

Dexamethasonpalmitat, in Lipidmikrosphären gebunden, reichert sich im entzündlichen Gewebe erheblich mehr an als freies Dexamethason. Wie Yokoyama et al. (1985) zeigen konnten, ist die Ursache für diese Anreicherung eine wesentlich bessere Aufnahme des Liposteroid in Makrophagen verglichen mit freiem Dexamethasonphosphat. Durch die höhere Inkorporation des Medikamentes in Makrophagen als wichtige Steroideffektorzellen kann es eine deutlich stärkere antientzündliche Aktivität entfalten. Die Bindung des Steroides an Lipidmikrosphären wirkt somit im Sinne eines „drug targeting“.

6.2. Veränderungen der humoralen Antwort

In einer Studie von Petrow et al. (1996a) konnte gezeigt werden, dass Autoimmunreaktionen gegen Kollagen Typ II und Knorpelproteoglykane als Bestandteile des Gelenkknorpels eine wichtige Rolle in der Unterhaltung der Gelenkentzündung bei der AIA spielen. Dies zeigt sich zum einen im immunisierungsabhängigen Auftreten von spezifischen autoreaktiven Lymphknotenzellen gegen Kollagen Typ II und Proteoglykane, konnte aber auch für das Auftreten autoreaktiver Immunglobuline gegen diese Gelenkantigene gezeigt werden. Darüber hinaus existieren Beobachtungen, dass durch intravenöse Verabreichung autoreaktiver Antikörper gegen Kollagen Typ II in gesunden Mäusen eine Synovitis ausgelöst werden kann (Holmdahl et al., 1986).

Die Bestimmung der Serumantikörper gegen das für die Arthritisinduktion verwendete methylierte Rinderserumalbumin (mBSA) und gegen die Bindegewebsantigene Kollagen Typ I und II sowie Proteoglykane als Komponenten der extrazellulären Matrix erfolgte zur Beurteilung des Einflusses von Glukokortikoiden auf die humorale Immunantwort in der Pathogenese der AIA. Die getesteten Serumantikörper unterliegen nur in geringem Maße einer Beeinflussung durch die unterschiedlichen Dosierungen von Lipotalon. Eine Dosis von 0,5 mg/kg Lipotalon führte zwar zu einem geringen Rückgang der bestimmten Serumantikörper, diese Ergebnisse waren allerdings in den Studien der vorliegenden Arbeit inkonsistent. Ein eindeutiger Effekt der Glukokortikoidtherapie auf die humorale Immunantwort im Modell der AIA konnte hieraus nicht abgeleitet werden.

Durch einen vorzeitigen Abbruch der Behandlung zur Analyse des Reboundeffektes kam es zu Annäherung der Werte an die Kontrollgruppe.

6.3. Einfluss auf die Funktion von Makrophagen

Im Pathogeneseprozess der RA sind Makrophagen beteiligt, die nicht nur am Ort der Entzündung, im Gelenk, sondern auch systemisch agieren. Sie produzieren spontan als auch nach Stimulation, zum Beispiel mit Lipopolysacchariden (LPS), große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF α . Diese proinflammatorischen Zytokine haben eine wesentliche Bedeutung bei der Auslösung und Unterhaltung der entzündlichen Prozesse im Rahmen der RA (Hein et al., 1995).

Makrophagen tragen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen zur adaptiven Immunantwort, der Erkennung und Entfernung von Pathogenen, bei.

Die Aktivierung von Makrophagen erfolgt zum einen durch die IFN γ -Sekretion und

Signalinduktion mittels Zell-Zell-Kontakt mit aktivierten Th1-Zellen und führt zu einer Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Th2-Zellen, die kein IFN γ produzieren, aktivieren Makrophagen nicht effektiv. Die Bindung von Superantigenen, wie bakterielle Lipopolysaccharide, an Toll-like-Rezeptoren der Makrophagen führt ebenso zur Makrophagenaktivierung (Jin et al., 2005).

Die immunsuppressive Wirkung von Glukokortikoiden wird intrazellulär über zwei verschiedene Wege vermittelt: GC werden nach Penetration in die Zelle an einen zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (cGCR) gebunden, dadurch wird dieser aktiviert. Der aktivierte GC/cGCR-Komplex wird in den Zellkern transloziert und induziert durch Bindung an sogenannte „glucocorticoid response elements“ (GRE) auf der DNA die Produktion von Regulatorproteinen wie I κ B. Diesen Prozess bezeichnet man als „Transaktivierung“. Andererseits wirkt der aktivierte GC/cGCR-Komplex inhibitorisch auf verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF κ B (nuclear factor kappa B) und AP-1 (activator protein-1). Über diesen, als „Transrepression“ bezeichneten Mechanismus können Glukokortikoide beispielsweise die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF α in Makrophagen hemmen (Buttgereit et al., 2004, 2005a; Scheinman et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit sollte insbesondere die supprimierende Wirkung von Lipotalon auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen untersucht werden.

6.3.1. Reboundeffekt der inflammatorischen Aktivität von Makrophagen nach Absetzen einer Therapie mit Lipotalon

Mengozzi et al. (1994) untersuchten die Wirkung von Dexamethason auf die Zytokinproduktion im Serum. Dexamethason zeigte einen inhibierenden Effekt auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 und IL-6 und nach Therapieende wird hier ein Reboundphänomen beschrieben. Auf IL-10 als protektives Zytokin konnte keine Wirkung durch Dexamethason nachgewiesen werden. Bei der akuten strahleninduzierten Entzündung in der Mauslunge wurde durch die Behandlung mit Dexamethason eine Suppression der proinflammatorischen Zytokinlevel bei frühzeitiger Therapie erreicht. Nach einer wirkungsvoller Kurzbehandlung mit Dexamethason wurde eine Hemmung der Genexpression der proinflammatorischen Zytokine erzielt, allerdings zeigte sich ein Reboundeffekt, sobald die Wirkung der Behandlung nachließ (Hong et al., 2001).

Nach Beendigung einer Behandlung mit Dexamethason zeigte sich in den vorliegenden klinischen Untersuchungen ein Reboundeffekt. Wir bestimmten daher die Zytokinkonzentration in den Überständen stimulierter Makrophagen aus arthritischen und in vivo mit Lipotalon therapierten Tieren und konnten eine deutliche Reduktion des

proinflammatorischen $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 unter kontinuierlicher Dexamethasontherapie nachweisen, während ein vorzeitiger Abbruch der Kortikoidbehandlung zu einem starken Anstieg der Zytokinkonzentrationen führte. Auf die Produktion von IL-10 zeigte Dexamethason in unserer Studie nur einen geringen senkenden Effekt unter kontinuierlicher Behandlung, ein Reboundphänomen ließ sich für IL-10 nicht darstellen.

6.3.2. Makrophagenaktivität im Verlauf der Arthritis unter Therapie mit Lipotalon

Bei der Streptokokken-Zellwand-induzierten Arthritis (SCWIA) der Ratte lässt sich in den ersten drei Tagen nach Induktion der Arthritis eine hohe Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ nachweisen, die bis zum Tag 7 wieder deutlich abnimmt (Rioja et al., 2004).

Im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Maus spiegelt sich das antientzündliche Wirkungsprofil von Prednisolon auch in den Zytokinkonzentrationen wider. Die Konzentration an IL-6 hat einen Tag nach Arthritisauslösung den höchsten Peak und sinkt kontinuierlich im Verlauf ab. Ab Tag 4 der Behandlung mit Prednisolon tritt eine Reduktion des IL-1-Levels ein, die sich im weiteren Verlauf der Arthritis fortsetzt, allerdings war dieser Effekt geringer ausgeprägt wie im Falle des IL-6. In dieser Studie konnte eine inhibitorische Wirkung auf die Konzentration an $\text{TNF}\alpha$ nur für höhere Therapiedosen an Prednisolon beobachtet werden. Allerdings lag die $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Kniegelenk insgesamt an der unteren Nachweisgrenze des verwendeten Zytokin-ELISA (Rioja et al., 2004).

Die AIA der Maus ist im Erkrankungsverlauf charakterisiert durch eine frühe Aktivierung der synovialen Makrophagen, die große Mengen an IL-6 und IL-1 synthetisieren. Auch die Konzentration an $\text{TNF}\alpha$ war erhöht, wenngleich nicht signifikant (Pohlers et al., 2005).

Bei der AIA der Maus zeigten Simon et al. (2001), dass, im Vergleich mit normalen Mäusen, die systemische Immunisierung assoziiert ist mit einem signifikanten Anstieg von $\text{TNF}\alpha$ im Serum, IL-1 im Gelenk, IL-6 in unstimulierten und IL-12p70 in stimulierten Makrophagen. Lokale Induktion führt überdies zu einem signifikanten Anstieg von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 im Gelenk sowie IL-1 und IL-6 im Serum und stimulierten Makrophagen in der akuten (d1) und der frühen chronischen Phase (d7) der AIA. In der späten chronischen Phase (d21) der AIA sinkt die Zytokinexpression wieder ab.

Der indirekte Effekt von Anti-CD4-Behandlung auf die Funktion der Makrophagen in der akuten und frühen chronischen Phase der AIA der Maus wurde von Nissler et al. (2004) beschrieben. In der akuten Phase (d3) unter Anti-CD4-Therapie zeigt sich eine signifikante Reduktion des IL-6-Levels, die Konzentration von IL-1 im Gelenk und in stimulierten

Makrophagen wird gesenkt, während die Expression von TNF α im Gelenk signifikant gesenkt wird und im Serum ansteigt.

Die Konzentration von TNF α und IL-1 in den Makrophagenüberständen sinkt unter Behandlung von Lipotalon im Vergleich zur Kontrolle im Verlauf der Arthritis und erreicht zum Behandlungsende in der chronischen Phase ihren niedrigsten Wert. Für TNF α ließ sich bei der unbehandelten Gruppe ein leichter Peak am Tag 7 zu Ende der akuten Phase und am Tag 21 in der chronischen Phase der Arthritis nachweisen.

IL-6 und IL-10 wurden in den Makrophagenüberständen nur unter Lipotalonbehandlung bestimmt. In der akuten Phase zeigt sich ein leichter Anstieg der IL-6-Konzentration, im Verlauf der chronischen Phase der Arthritis sinkt die IL-6-Konzentration unter der Behandlung mit Lipotalon. Zwei Tage nach Auslösung der AIA lässt sich die höchste Konzentration an IL-10 nachweisen, im Verlauf der Arthritis sinkt die Zytokinkonzentration und erreicht in der chronischen Phase wieder annähernd Werte wie am Tag der Auslösung der AIA.

6.3.3. Einfluss einer Therapie mit liposomal gebundenem Dexamethason auf die inflammatorische Makrophagenaktivität

Yokoyama et al. (1985) prüften den Einfluss von Lipotalon im Vergleich zu freiem Dexamethason auf die Funktion von Peritonealmakrophagen der Ratte. Es zeigte sich, dass Lipotalon von den Peritonealmakrophagen stärker aufgenommen wurde als freies Dexamethason. Des weiteren war der Hemmeffekt von Lipotalon auf die Phagozytose, die Chemotaxis und die Superoxidanionenfreisetzung wesentlich potenter als der von freiem Dexamethason.

Somit ist anzunehmen, dass auch die Wirkung auf die Zytokinproduktion von Makrophagen durch Lipotalon stärker beeinflusst wird als durch freies Dexamethason. Wir untersuchten die Zytokinkonzentrationen von TNF α , IL-1 und IL-12 in Makrophagenüberständen in der akuten (Tag 2) und chronischen Phase (Tag 21) der Arthritis. In der akuten Phase der Arthritis zeigte sich ein leichter Anstieg der TNF α -Konzentration unter Behandlung mit freiem Dexamethason als auch mit Lipotalon. Unter Behandlung mit Dexamethason wiesen wir in der chronischen Phase eine deutliche Reduktion von TNF α nach, wobei Lipotalon die TNF α -Konzentration noch effektiver senkte. IL-1 wird durch Lipotalon in beiden Arthritisphasen reduziert, freies Dexamethason hat nur am Tag 21 einen hemmenden Einfluss auf die Zytokinproduktion. Die Wirkung auf IL-12 am Tag 2 unter Behandlung von Dexamethason ist nur gering, am Tag 21 zeigt sich ein Konzentrationsabfall von IL-12 unter Einfluss von Dexamethason. Ein Unterschied zwischen Lipotalon und freiem Dexamethason ließ sich für

IL-12 nicht nachweisen.

Die Reduktion der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 war also unter Therapie mit dem liposomal verkapselten Dexamethason signifikant stärker ausgeprägt als mit freiem Dexamethason. Dies ist ein Effekt, der auf die bessere Phagozytose der Lipidmikrosphären durch Makrophagen und somit eine zielgerichtete Therapie mit Lipotalon zurückgeführt werden kann.

6.3.4. Einfluss von Lipotalon auf die Makrophagenaktivität in vitro

Die Produktion von TNF α in LPS-stimulierten Makrophagen wird unter Dexamethasonbehandlung vermindert (Miller and Hunt, 1998). Eine dosiabhängige Hemmung der Zytokinproduktion in Monozyten für die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-2 und TNF α unter Wirkung von Glukokortikoiden wurde auch von Hodge et al. (1999) gezeigt.

An LPS-stimulierten humanen Blut-Monozyten konnte eine Hemmung der IL-12-Produktion durch Dexamethason gezeigt werden. Auch die IL-10-Konzentration wurde in dieser Studie durch die Glukokortikoidtherapie dosisabhängig gehemmt, jedoch in sehr viel geringerem Ausmaß als IL-12 (Visser et al., 1998).

Die dosisabhängige Suppression von IL-1 in humanen Blut-Monozyten und in Alveolarmakrophagen unter Zusatz von Budesonid als potentes Glukokortikoid wiesen Brattsand et al. (1996) nach.

In unseren Untersuchungen konnten wir in kultivierten und mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten Peritonealmakrophagen aus Normaltieren, Tieren in der akuten Phase (Tag 7) und chronischen Phase der Arthritis (Tag 21) einen Abfall der Zytokine TNF α , IL-1 und IL-12 dosisabhängig unter Lipotalonbehandlung in vitro nachweisen. Der Effekt ist bereits bei sehr niedrigen Dosen an liposomal verkapseltem Dexamethason (5nMol/l) ausgeprägt. Es tritt also sowohl in Makrophagen aus der akuten wie auch der chronischen Erkrankungsphase eine Hemmung der proinflammatorischen Aktivität ein.

6.4. Einfluss auf das Th1/Th2-Gleichgewicht

CD4⁺ T-Helfer(Th)-Zellen aktivieren und steuern die Immunantwort hauptsächlich durch die Wirkung von Zytokinen, können aber selbst auch Effektorfunktion besitzen. Die einzelnen Subpopulationen unterscheiden sich anhand ihres speziellen Zytokinmusters. Das Zytokinmilieu während der Differenzierung und eine Vielzahl anderer Mechanismen

entscheidet, ob sich die proliferierende T-Zelle in eine Th1- oder Th2-Zelle differenziert. Die Zytokinregulation untereinander und die Konzentration der Interleukine bestimmen die Polarisation. Durch das Th2-Zytokin IL-4 konnten sich in Abhängigkeit der Serumkonzentration sowohl Th2- als auch Th1-Zellen differenzieren (Lingnau et al., 1998). Nach erfolgter Differenzierung ist es nicht mehr möglich, das Zytokinmuster der Th1- oder Th2-Zellen zu beeinflussen (Isomaki et al., 1999).

Diese gezielte Polarisation zu Th1- oder Th2-Zellen bewirkt im Körper eine Modulation der Th1/Th2-Balance und kann somit eine zelluläre (Th1) oder humorale (Th2) Immunantwort induzieren. Zwei weitere Th-Subpopulationen, T-Helfer-3 (Th3) und T-regulatorische-1 (Tr1) Zellen, die die zelluläre und humorale Immunantwort steigern oder hemmen können, wurden beschrieben (Del Prete et al., 1995). Th3-Zellen werden durch die Aufnahme von Antigen über mukosale Oberflächen induziert (orale Toleranz) und hemmen Immunantworten über ihre Sekretion von TGF- β . Tr1-Zellen entstehen durch die chronische Antigenstimulation naiver T-Zellen in Gegenwart von IL-10 und unterdrücken durch IL-10-Produktion die Immunreaktion (Sakaguchi, 2004). Sowohl Tr1- als auch Th3-Zellen sind bei RA-Patienten im entzündeten Synovialgewebe nachweisbar, jedoch geringer als bei Patienten mit einer reaktiven Arthritis (Appel et al., 2004).

Die Aktivierung von Makrophagen durch die IFN γ -Sekretion und Signalinduktion über die CD40-Ligand/CD40-Interaktion ist eine der wichtigsten Funktionen der Th1-Zellen. Für die zellvermittelte Immunität und damit für die Abwehr intrazellulär lebender Mikroorganismen (z.B. Mykobakterien) sind aktivierte Makrophagen essentiell. B-Zellen werden zur Proliferation, Differenzierung und Produktion von Immunglobulinen der Subklassen IgG2a und IgG2b stimuliert. Daraus resultiert eine Induktion der zellulären Immunität und auf der Basis dieses Mechanismus die Ausbildung der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ (DTH-Reaktion).

Th2-Zellen sind essentiell für die Aktivierung der humoralen Antwort. Sie sezernieren vorwiegend IL-4 und IL-10 und stimulieren vor allem durch IL-4 B-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen. Dabei wird hauptsächlich der Isotypenwechsel von IgM zu IgG1 und IgE unterstützt.

Die Th1-vermittelte Effektorfunktion, wie beispielsweise die Makrophagenaktivierung, scheint bei Autoimmunerkrankungen eine große Bedeutung zu besitzen, ebenso wie Th2-Zellen für die Pathogenese allergischer Entzündungen entscheidend sind (Abbas et al., 1996; Skapenko et al., 2005).

Lange Zeit wurde vermutet, dass sich die Pathogenesemechanismen, die zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen, aus einem Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen erklären lassen. Allerdings sind IFN γ -defiziente Mäuse viel empfindlicher für die Induktion

von Autoimmunität im Tiermodell (Kelchtermans et al., 2005). Der Verlauf experimenteller Arthritiden kann bei Fehlen von IL-4 unbeeinflusst sein, was gegen eine protektive Rolle von Th2-Zellen spricht (Hata et al., 2004). In letzter Zeit wurden T-Helfer-Zellen beschrieben, die sich nicht als Th1- oder Th2-Zellen klassifizieren lassen und proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-6 und IL-17 produzieren. Diese Zytokine haben entzündungsfördernde Wirkung auch auf Stromazellen wie Fibroblasten. Diese T-Zell-Subpopulation könnte wichtig für die Entstehung von Gewebsentzündungen sein und damit eine Rolle in der Pathogenese der gewebsdestruktiven Autoimmunerkrankungen spielen. Die IL-17-produzierenden Th17-Zellen wurden für die Förderung von autoimmunne Entzündungsreaktionen in Tiermodellen der Multiplen Sklerose verantwortlich gemacht (Langrish et al., 2005; van Roon et al., 2006). Im arthritischen Gelenk kommen Th17-Zellen in großen Mengen vor (Chabaud et al., 1999). Die Auslösung einer Kollagen-induzierten Arthritis in IL-17-defizienten Mäusen gelang nicht (Nakae et al., 2003).

Sogenannte natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) limitieren Immunreaktionen, die durch autoreaktive T-Zellen ausgelöst werden. Regulatorische T-Zellen exprimieren CD4 und CD25, sind eher anerge, wenig proliferative Zellen, die nur wenige Zytokine sezernieren. Frey et al. (2005) konnten nachweisen, dass CD4+CD25+ die Erkrankungsschwere auch in der AIA beeinflussen. Durch CD25-Depletion wurde die Arthritis sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase verstärkt, die Schwere der Arthritis konnte durch einen Transfer von CD4+CD25+-Zellen signifikant reduziert werden. Die immunsupprimierenden Effekte der nTreg-Zellen werden durch den direkten Zell-Zell-Kontakt mit der Effektor-T-Zelle und mit Antigen-präsentierenden Zellen wie Monocyten und Dendritischen Zellen vermittelt. Die Expression von kostimulatorischen Molekülen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α und IL-6, wird so durch die nTreg-Zellen inhibiert (van Roon et al., 2006).

T-Zellen können in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand, bestimmt durch kostimulatorische Moleküle und Zytokine, unterschiedliche Effektorfunktionen ausführen. Die Einteilung in Th1- und Th2-Zellen hat sich lange bewährt, allerdings werden so die komplexen Abläufe der Immunantwort relativ vereinfacht dargestellt.

6.4.1. Wirkung einer Therapie mit Lipotalon auf das Th1/Th2-Gewicht in vivo

Durch die Regulation der Aktivität anderer Zellen des Immunsystems beeinflussen aktivierte CD4+ T-Zellen den Verlauf der spezifischen Immunreaktion und erlangen so eine zentrale Rolle in der Immunpathogenese der RA. Die immunmodulatorische Wirkung von Lipotalon

und die Regulierung der Immunfunktion durch Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2-Zellen sollte in unseren Studien im Modell der AIA der Maus untersucht werden.

Zur Untersuchung des Th1/Th2-Gleichgewichtes wurden die Ig-Subklassen IgG1, IgG2a und IgG2b in den Seren der arthritischen Mäuse bestimmt.

Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 0,5 mg/kg Lipotalon eine Senkung der Produktion aller Subklassen von Immunglobulinen eintritt. Lipotalon in einer Konzentration von 0,05 mg/kg bzw. 0,25 mg/kg hemmt dagegen insbesondere die Subklassen IgG2a und IgG2b, während IgG1 annähernd unbeeinflusst bleibt. Daraus ergibt sich bei Betrachtung des IgG2a/IgG1- bzw. IgG2b/IgG1-Quotienten jeweils eine relative Verschiebung hin zu den Th1-spezifischen Subklassen IgG2a und IgG2b unter Therapie mit 0,5 mg/kg Lipotalon, während sich das Verhältnis bei den beiden niedrigeren Dexamethason-Konzentrationen (0,05 mg/kg und 0,25 mg/kg) hin zur Th2-spezifischen Immunglobulinsubklasse IgG1 verschiebt.

In einer weiteren Studie zeigt sich unter laufender Therapie mit Lipotalon eine deutlichen Senkung der Antikörperlevel für IgG1 und IgG2b. Bei Abbruch der Therapie am Tag 7 tritt eine Erhöhung der Konzentration von IgG1 und IgG2b im Verlauf der chronischen Phase der AIA ein. Bildet man den Quotienten von IgG2b/IgG1, stellt man zunächst fest, dass IgG1 sowohl nach Behandlung über den gesamten Beobachtungszeitraum als auch nach Abbruch der Therapie am Tag 7 überproportional stärker gehemmt wird als IgG2b. Dies würde für eine Verschiebung hin zu den Th1-Zellen unter Therapie mit Dexamethason sprechen. Jedoch sind diese Effekte nicht statistisch signifikant und verglichen mit der Dosisfindungsstudie sind die Ergebnisse inkonstant. Hinzu kommt, dass die Produktion an IgG2a fast vollständig unbeeinflusst bleibt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der verwendete Mausstamm C57BL/6 kein guter Responder hinsichtlich der IgG2a-Subklasse ist (Nissler, 1999). Darüber hinaus zeigt der IgG2b/IgG1-Quotient, dass im Rahmen des Reboundeffektes nach Therapieabbruch an Tag 7 im weiteren Erkrankungsverlauf keine signifikante Veränderung des Verhältnisses an Th1- und Th2-Immunglobulinsubklassen stattfindet.

Die Behandlung mit Dexamethason führt in der Öl-induzierte Arthritis der Maus zur signifikanten Senkung der Antikörperlevel für IgG1, IgG2a wird nur gering beeinflusst (Carlsten et al., 1996).

In der Antigen (Ovalbumin)-induzierten Arthritis der Maus zeigt sich unter der Behandlung mit Dexamethason eine Hemmung sowohl der Th1- als auch der Th2-Immunantwort, dabei wird eine stärkere Suppression von Th1 im Vergleich zur Th2-Antwort nachgewiesen und somit eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2-Zellen erreicht (Yamaki et al., 2005).

Um die Wirkung der GC auf das Th1/Th2-Gleichgewicht antigenspezifischer T-Zellen

genauer zu untersuchen, wurden in einem weiteren Versuchsansatz die Konzentrationen an mBSA-spezifischen Immunglobulinen im Serum der arthritischen Tiere unter Therapie mit unterschiedlichen Dosen an Lipotalon bestimmt. Unter Behandlung mit 0,5 mg/kg Lipotalon zeigte sich eine Senkung der Produktion von antigenspezifischen IgG1, während antigenspezifische IgG2a und IgG2b kaum beeinflusst wurden. In niedrigerer Dosierung hemmt Lipotalon dagegen insbesondere IgG2b, während IgG1 und IgG2a annähernd unbeeinflusst bleiben. Das Verhältnis bei den beiden niedrigeren Dexamethason-Konzentrationen (0,05 mg/kg und 0,25 mg/kg) verschiebt sich eher in Richtung Th2-Immunantwort. Eine relative Verschiebung hin zu den Th1-spezifischen Immunantwort wird unter Therapie mit 0,5 mg/kg Lipotalon beobachtet.

In einer weiteren Studie sollte untersucht werden, ob sich bei Abbruch einer GC-Therapie ein Reboundeffekt hinsichtlich der antigenspezifischen Immunglobulinsubklassen aus den Seren arthritischer Tiere nachweisen lässt. Bei fortdauernder Behandlung mit Lipotalon zeigte sich eine Senkung der Konzentration aller drei antigenspezifischer Immunglobuline. Ein Abbruch der Therapie führt dagegen zu einem Wiederanstieg von antigenspezifischem IgG1, IgG2a und IgG2b. Die Behandlung mit Lipotalon bewirkt eine Hemmung der Th1- und der Th2-Immunantwort, dabei fällt eine stärkere Supprimierung von Th1 und so eine Verschiebung hin zu der Th2-Immunantwort auf, während bei Therapieabbruch nach 7 Tagen die Th1- und Th2-spezifischen IgG-Subklassen gleichermaßen gehemmt werden.

Yang et al. (2004) beobachteten gleichermaßen, dass die antigenspezifischen IgG-Antikörper in arthritischen Mäusen unter Dexamethason-Therapie signifikant gesenkt wurden.

In einer anderen Studie untersuchten Yamaki et al. (2005) verschiedene Antirheumatika und ihren Einfluss auf die Th1- und Th2-Immunantwort. Die inhibierenden Effekte von Dexamethason wirkten sich stärker auf die antigenspezifische IgG2a-Produktion als auf die antigenspezifische IgG1-Produktion aus und beeinflussten somit sowohl die Th1- als auch die Th2-Immunantwort. Da die Wirkung auf Th1 effektiver ist, wird das Gleichgewicht in Richtung Th2 verschoben.

Insgesamt kann unter Betrachtung aller Ergebnisse über mehrere Therapiestudien keine eindeutige Beurteilung einer Beeinflussung des Verhältnis an Th1- und Th2-spezifischen Ig-Subklassen erfolgen, da die Ergebnisse inkonstant und nicht signifikant sind. Somit kann aus diesen Ergebnissen kein eindeutiger Hinweis auf eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes gefunden werden.

6.4.2. T-Zell-Aktivität im Verlauf der Arthritis unter Therapie mit Lipotalon

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung des Einflusses von Lipotalon auf das Th1/Th2-Gleichgewicht ist der Nachweis der Th1- (IL-2 und IFN γ) und Th2-Zytokine (IL-4 und IL-10).

Unter Therapie mit liposomal gebundenem Dexamethason wurden im Verlauf der Arthritis zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der akuten und chronischen Phase der AIA Milzzellen gewonnen und nach Stimulation mit PMA und Ionomycin die Zytokinkonzentrationen für IFN γ , IL-2 und IL-10 bestimmt. In der akuten Phase der AIA beobachteten wir einen leichten Anstieg der IFN γ -Konzentration unter Dexamethason-Therapie im Vergleich zur Kontrolle. In der chronischen Phase ließ sich eine verstärkte Hemmung der Zytokinproduktion unter Therapie nachweisen. Der Einfluss auf die Produktion von IL-2 in der akuten Phase der AIA erwies sich als gering, allerdings zeigte sich eine deutliche Reduktion der IL-2-Konzentration im chronischen Verlauf. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wird unter Dexamethason-Behandlung vermehrt während des gesamten Verlaufes der Arthritis nachgewiesen. Es kommt also zu einer Reduktion der proinflammatorischen Th1-Zytokine (IFN γ und IL-2) und zu einer vermehrten Expression des antiinflammatorischen Th2-Zytokin IL-10 und somit zu einer Verlagerung des Th1/Th2-Gleichgewichts in Richtung Th2.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten verschiedener Autoren. Van Wauwe et al. (1995) beschreibt eine potente Hemmung der Produktion von IL-2 und IFN γ unter Einfluss von Dexamethason. Die Therapie mit Dexamethason resultierte in einer rapiden und anhaltenden Reduktion der Krankheitsaktivität der RA. Die IL-10-Produktion steigt unter Dexamethason-Behandlung und ist über mindestens 6 Wochen anhaltend. Der ausgeprägte immunsupprimierende Effekt der Glukokortikoidbehandlung zeigt sich am deutlichsten in der Hemmung von IFN γ (Verhoef et al., 1999). Eine vermehrte IL-10-Produktion in Patienten mit RA führt zu einem protektiven Effekt besonders gegen das Fortschreiten der Gelenksdestruktion (Verhoef et al., 2001)

6.4.3. Einfluss von liposomal gebundenem Dexamethason auf die Funktionen CD4+ T-Zellen in vitro

Aus Normaltieren sowie aus arthritischen Mäusen in der akuten (7d nach Auslösung der AIA) und chronischen Phase (21d nach Auslösung der AIA) der Erkrankung wurden Milzzellen gewonnen, in vitro mit ConA stimuliert und der Einfluss verschiedener Konzentrationen an Lipotalon auf die Zytokinproduktion untersucht.

Sowohl bei Lymphozyten aus der akuten wie aus der chronischen Phase der Arthritis zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der Produktion an IFN γ , einem Th1-Zytokin. Das Th2-Zytokin IL-4 wurde in der chronischen Phase unter Lipotalon vermehrt nachgewiesen, wobei die höchste Konzentration Lipotalon den stärksten Effekt erzielte. Eine IL-10-Produktion durch die ConA-stimulierten T-Zellen konnte in vitro nicht nachgewiesen werden.

Hodge et al. (1999) zeigten gleichermaßen eine dosisabhängige Modulation der Zytokin-Produktion von T-Zellen unter Glukokortikoiden (Dexamethason und Prednisolon). Die antientzündliche Wirkung der GC erfolgte durch Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Th1-Zytokinen (z.B. IFN γ und IL-2) und einer verstärkten Bildung von antientzündlichem IL-10, einem Th2-Zytokin.

In einer Studie von Verhoef et al. (1999) wurde die In-vitro-Interleukinproduktion peripherer Blutmonozyten aus RA-Patienten vor und nach einer Dexamethason-Pulstherapie untersucht. Dabei war die inhibitorische Wirkung von Dexamethason auf IFN γ wesentlich stärker als auf IL-4. Die Untersuchung des Verhältnisses von IFN γ zu IL-4 verdeutlichte, dass unter Behandlung mit Dexamethason die Produktion des Th1-Zytokins IFN γ viel effektiver gehemmt wird, während die Konzentration des Th2-Zytokins IL-4 nur geringfügig reduziert wird. Eine IL-10-Produktion konnte nicht nachgewiesen werden.

7. Schlussfolgerung / Ausblick

Eine Dosis von 0,5 mg/kg/d Lipotalon i.p., ab dem Tag der Arthritisinduktion verabreicht, erwies sich klinisch, histologisch und gegenüber der T-Zell-Reaktivität (DTH) als wirksamste Konzentration. Ein Absetzen dieser Therapie am Tag 7 der Arthritis rief einen sowohl histologisch als auch anhand der T-Zell-Reaktivität im DTH-Test nachweisbaren Reboundeffekt hervor. Im Vergleich mit freiem Dexamethason war Lipotalon klinisch, histologisch sowie bezüglich der DTH-Reaktion signifikant wirksamer. Ein eindeutiger Effekt der GC-Therapie im Modell der AIA auf die humorale Immunantwort konnte nicht abgeleitet werden.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Arthritis wurden von therapierten Tieren Peritonealmakrophagen und Milzlymphozyten präpariert, in vitro stimuliert und nach 24h Kultur in den Überständen die Zytokine mittels ELISA bestimmt. Durch die Glukokortikoidtherapie kam es – verglichen mit Kontrollen – zu einer deutlichen und zunehmenden Hemmung der TNF α -, IL-1- und IL-12-Produktion der Peritonealmakrophagen sowie in der chronischen Phase der Erkrankung zu einer Senkung der IFN γ - und IL-2-Sekretion der Milzlymphozyten. Während das antiinflammatorische und protektiv wirkende Th2-Zytokin IL-10 unter Lipotalonbehandlung in Makrophagen nur wenig beeinflusst wurde, produzierten Milzlymphozyten unter dieser Therapie vermehrt IL-10. Wie in den klinischen Studien gezeigt, tritt auch bezüglich des Zytokinverlaufes in vitro nach Absetzen der Therapie am Tag 7 ein deutlicher Reboundeffekt ein, die Produktion von TNF α und IL-1 lag nach Absetzen der Therapie deutlich über der Kontrolle. Lipotalon zeigte gegenüber freiem Dexamethason eine potentere hemmende Wirkung auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF α , IL-1, IL-12) in Peritonealmakrophagen.

In weiteren In-vitro-Studien konnte demonstriert werden, dass Lipotalon in LPS-stimulierten Peritonealmakrophagen die Sekretion von TNF α , IL-1 und IL-12 verringert. In ConA-stimulierten Milzlymphozyten hemmt Lipotalon die Produktion von IFN γ und steigert die IL-4-Sekretion.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Therapie mit Dexamethason in freier oder verkapselter Form eine Hemmung der proinflammatorischen Zytokine und eine Verschiebung der Th1/Th2- Balance zu den antiinflammatorisch wirksamen Th2-Zellen bewirkt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lipotalon sowohl klinisch als auch auf zellulärer Ebene eine stärkere Wirksamkeit als freies Dexamethason besitzt. Durch eine stärkere selektive Anreicherung im entzündlichen Gewebe und eine bessere Aufnahme des Liposteroids in Makrophagen durch Phagozytose wird ein sogenanntes „drug targeting“

erreicht, was zu einer stärkeren antientzündlichen Aktivität des Medikaments führt. Darüber hinaus verbleiben liposomal verkapselte GC länger im entzündlichen Gewebe. Insgesamt ist damit eine niedrigere therapeutische Dosierung bei gleicher antientzündlicher Effektivität möglich. Hierdurch und infolge der Verkapselung der GC in Liposomen kann das Auftreten von Glukokortikoid-Nebenwirkungen reduziert werden.

Sowohl in den Therapiestudien als auch in vitro zeigte sich ein deutlicher Reboundeffekt nach Absetzen der GC-Therapie. Ziel neuer Therapieregimes muss es sein, diesen zu minimieren. Hierfür sind neben klassischen Kombinationstherapien mit DMARDs und der klassischen Dosisreduktion auch eine Simultanbehandlung mit neuentwickelten antiinflammatorischen Medikamenten wie beispielsweise der SODm (superoxide dismutase mimetic) denkbar.

Eine Möglichkeit zur Weiterentwicklung des Konzeptes der lipidmikrosphärenverkapselten GC könnte in der Entwicklung lang zirkulierender liposomaler GC mit hydrophilen Polymeren wie Polyethylen-Glykol (PEG) an der Oberfläche der Liposomen bestehen. Diese verhindert einen schnellen Abbau in Leber und Milz und verlängert damit die Halbwertszeit des Medikaments im Organismus. Zu einer weiteren Verbesserung der Phagozytose in Makrophagen könnten Lipid-Nanosphären dienen - lipoproteinähnliche artifizielle Partikel mit einem Durchmesser von 25-50nm.

Ein Großteil der antiinflammatorischen Effekte der GC wird über den Mechanismus der Transrepression vermittelt. Demgegenüber sind die meisten GC-Nebenwirkungen durch die vermehrte Synthese von Aktivatorenzymen (Transaktivierung) durch GC bedingt. Dieser Zusammenhang kann für die Entwicklung selektiver Glukokortikosteroid-Rezeptoragonisten (SEGRA), die vorwiegend die Transrepression hemmen, genutzt werden.

Die Fortführung und Weiterentwicklung des Therapiekonzeptes der GC wird sicherlich auch zukünftig ein unverzichtbarer Bestandteil der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen, bleiben.

8. Literaturverzeichnis

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787-93.
2. Aeberli D, Oertle S, Mauron H, Reichenbach S, Jordi B, Villiger PM. 2002. Inhibition of the TNF-pathway: use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in cases of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med Wkly*, 132(29-30), 414-22.
3. Afeltra A. 2001. Treatment of rheumatoid arthritis: new therapeutic approaches with biological agents. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 1(1), 45-65.
4. Amano K. 2002. [Systemic corticosteroids in rheumatoid arthritis: to use or not to use?]. *Nippon Rinsho*, 60(12), 2364-69.
5. Appel H, Neure L, Kuhne M, Braun J, Rudwaleit M, Sieper J. 2004. An elevated level of IL-10- and TGFbeta-secreting T cells, B cells and macrophages in the synovial membrane of patients with reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 23(5), 435-40.
6. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31(3), 315-24.
7. Bär C, Bias P, Rose P. 1997. Dexamethasonpalmitat bei akuter Epikondylitis humeri radialis. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 47, Heft 3, 119-24.
8. Barnes PJ, Adcock I. 1993. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*, 14(12), 436-41.
9. Blaschke S, Schwarz G, Moneke D, Binder L, Muller G, Reuss-Borst M. 2000. Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 27(4), 866-73.
10. Bluestone JA, Abbas AK. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 3(3), 253-57.
11. Boeger CA, Kellner H. 2001. [Neurologic Complication of Therapy in Rheumatic Diseases]. *Akt Rheumatol*, 26, 285 - 290.
12. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. 2006. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*, 295(19), 2275-85.
13. Boots AM, Wimmers-Bertens AJ, Rijnders AW. 1994. Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology*, 82(2), 268-74.
14. Borghaei RC, Rawlings PL, Jr., Mochan E. 1998. Interleukin-4 suppression of interleukin-1-induced transcription of collagenase (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 41(8), 1398-406.
15. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. 1977. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, 20(3), 841-50.
16. Brattsand R, Linden M. 1996. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther*, 10 Suppl 2, 81-90; discussion 91-2.
17. Brauer R, Egg AJ, Henzgen S, Kriegsmann J, Thoss K. 1993. The effects of immunomodulatory thymic and splenic peptides and cyclosporin A on antigen-induced arthritis in the rat. *Agents Actions*, 38 Spec No, C95-7.
18. Buttgerit F, Wehling M, Burmester GR. 1998. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum*, 41(5), 761-67.
19. Buttgerit F, da Silva JA, Boers M, Burmester GR, Cutolo M, Jacobs J, et al. 2002. Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment

- regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann Rheum Dis*, 61(8), 718-22.
20. Buttgereit F. 2003. Current issues of basic and clinical glucocorticoid research. *Clin Exp Rheumatol*, 21(2), 145-47.
 21. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. 2004. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum*, 50(11), 3408-17.
 22. Buttgereit F, Song IH, Straub RH, Burmester GR. 2005a. [Current insights into the development of new glucocorticoid receptor ligands]. *Z Rheumatol*, 64(3), 170-76.
 23. Buttgereit F, Burmester GR, Lipworth BJ. 2005b. Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear. *Lancet*, 365(9461), 801-03.
 24. Cao D, Borjesson O, Larsson P, Rudin A, Gunnarsson I, Klareskog L, et al. 2006. FOXP3 identifies regulatory CD25bright CD4+ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol*, 63(6), 444-52.
 25. Carlsten H, Verdrengh M, Taube M. 1996. Additive effects of suboptimal doses of estrogen and cortisone on the suppression of T lymphocyte dependent inflammatory responses in mice. *Inflamm Res*, 45(1), 26-30.
 26. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 42(5), 963-70.
 27. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, et al. 2006. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, 116(5), 1317-26.
 28. Chikanza IC, Kozaci DL. 2004. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology (Oxford)*, 43(11), 1337-45.
 29. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. 1991. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 34(9), 1125-32.
 30. Conn DL. 2001. Resolved: Low-dose prednisone is indicated as a standard treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 45(5), 462-67.
 31. Connell L, McInnes IB. 2006. New cytokine targets in inflammatory rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20(5), 865-78.
 32. Cooke TD, Sumia M, Elliott S, Maeda M. 1983. Immune complex mediated destruction of cartilage in antigen-induced arthritis of rabbits. *J Rheumatol Suppl*, 11, 103-07.
 33. Cooke TD, Sumi M, Maeda M. 1985. Deleterious interactions of immune complexes in cartilage of experimental immune arthritis. I. The erosion of pannus-free hyaline cartilage. *Clin Orthop*, 193, 235-45.
 34. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, 283(5748), 666-68.
 35. Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. 1977. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med*, 146(6), 1585-602.
 36. Crossley MJ, Spowage M, Hunneyball IM. 1987. Studies on the effects of pharmacological agents on antigen-induced arthritis in BALB/c mice. *Drugs Exp Clin Res*, 13(5), 273-77.
 37. Cush JJ, Tugwell P, Weinblatt M, Yocum D. 1999. US consensus guidelines for the use of cyclosporin A in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 26(5), 1176-86.
 38. Cutolo M, Montecucco CM, Cavagna L, Caporali R, Capellino S, Montagna P, et al. 2006. Serum cytokines and steroidal hormones in polymyalgia rheumatica and elderly-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*.
 39. Cuzzocrea S, Mazzon E, Paola RD, Genovese T, Muia C, Caputi AP, et al. 2005. Effects of combination M40403 and dexamethasone therapy on joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 52(6), 1929-40.

40. Dass S, Vital EM, Emery P. 2006. Rituximab: novel B-cell depletion therapy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Pharmacother*, 7(18), 2559-70.
41. Dayer JM, Burger D. 1999. Cytokines and direct cell contact in synovitis: relevance to therapeutic intervention. *Arthritis Res*, 1(1), 17-20.
42. DeKruyff RH, Fang Y, Umetsu DT. 1998. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J Immunol*, 160(5), 2231-37.
43. Del Prete G, De Carli M, D'Elia MM, Daniel KC, Almerigogna F, Alderson M, et al. 1995. CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. *J Exp Med*, 182(6), 1655-61.
44. Deleuran BW, Chu CQ, Field M, Brennan FM, Katsikis P, Feldmann M, et al. 1992. Localization of interleukin-1 alpha, type 1 interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the synovial membrane and cartilage/pannus junction in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 31(12), 801-09.
45. Devogelaer JP, Goemaere S, Boonen S, Body JJ, Kaufman JM, Reginster JY, et al. 2006. Evidence-based guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int*, 17(1), 8-19.
46. Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. 1996. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39(12), 1961-69.
47. Dozmorov IM, Miller RA. 1998. Generation of antigen-specific Th2 cells from unprimed mice in vitro: effects of dexamethasone and anti-IL-10 antibody. *J Immunol*, 160(6), 2700-05.
48. Dumonde DCG, L.E. 1962. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br. J. Exp. Pathol*, 43, 373-83.
49. Eder, M., Gedigk, P. 1990. *Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
50. Farmer LM, Watt G, Glatt M, Blaettler A, Loutis N, Feige U. 1986. Delayed type hypersensitivity (DTH) to type II collagen (CII) in DBA-1 mice. *Clin Exp Immunol*, 65(2), 329-35.
51. Feldmann M, Charles P, Taylor P, Maini RN. 1998. Biological insights from clinical trials with anti-TNF therapy. *Springer Semin Immunopathol*, 20(1-2), 211-28.
52. Field M, Chu C, Feldmann M, Maini RN. 1991. Interleukin-6 localisation in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 11(2), 45-50.
53. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Park LS, et al. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*, 8, 303-33.
54. Forre O, Haugen M, Hassfeld WG. 2000. New treatment possibilities in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 29(2), 73-84.
55. Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, et al. 2005. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther*, 7(2), R291-301.
56. Gametchu B, Watson CS, Wu S. 1993. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *Faseb J*, 7(13), 1283-92.
57. Gatto B. 2006. Biologics targeted at TNF: design, production and challenges. *Reumatismo*, 58(2), 94-103.
58. Gay S, Gay RE, Koopman WJ. 1993. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis*, 52 Suppl 1, S39-47.
59. Geiler T, Kriegsmann J, Keyszer GM, Gay RE, Gay S. 1994. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal

- human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum*, 37(11), 1664-71.
60. Geiler T, Lorenz HM, Kalden JR, Manger B. 1997. [Pathogenesis of rheumatoid arthritis]. *Med Klin*, 92(6), 347-53.
 61. Gifford GE, Lohmann-Matthes ML. 1987. Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J Natl Cancer Inst*, 78(1), 121-24.
 62. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. 1987. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum*, 30(2), 201-12.
 63. Gold R, Buttgerit F, Toyka KV. 2001. Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol*, 117(1-2), 1-8.
 64. Griffiths RJ. 1992. Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions*, 35(1-2), 88-95.
 65. Gronemeyer H. 1992. Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *Faseb J*, 6(8), 2524-29.
 66. Hang L, Theofilopoulos AN, Dixon FJ. 1982. A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. *J Exp Med*, 155(6), 1690-701.
 67. Harris ED, Jr. 1990. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*, 322(18), 1277-89.
 68. Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, Iwakura Y, Sekikawa K, Azuma Y, et al. 2004. Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J Clin Invest*, 114(4), 582-88.
 69. Hein G, Bolwin R, Brauer R, Eidner T, Franke S, Oelzner P, et al. 1995. [Rheumatology update--1. Summary of clinically significant current knowledge and outlook perspective of relevant trends in etiopathogenetic research, diagnostic methods and therapeutic possibilities]. *Med Klin*, 90(4), 231-39.
 70. Henzgen S, Petrow PK, Thoss K, Brauer R. 1996. Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice. A scanning and transmission electron microscopic study. *Exp Toxicol Pathol*, 48(4), 255-63.
 71. Herold, G. 1997. Innere Medizin. Köln: Herold.
 72. Hickling P, Jacoby RK, Kirwan JR. 1998. Joint destruction after glucocorticoids are withdrawn in early rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism Council Low Dose Glucocorticoid Study Group. *Br J Rheumatol*, 37(9), 930-36.
 73. Hodge S, Hodge G, Flower R, Han P. 1999. Methyl-prednisolone up-regulates monocyte interleukin-10 production in stimulated whole blood. *Scand J Immunol*, 49(5), 548-53.
 74. Holmdahl R, Rubin K, Klareskog L, Larsson E, Wigzell H. 1986. Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis, using monoclonal anti-type II collagen antibodies. *Arthritis Rheum*, 29(3), 400-10.
 75. Hong JH, Chiang CS, Tsao CY, Lin PY, Wu CJ, McBride WH. 2001. Can short-term administration of dexamethasone abrogate radiation-induced acute cytokine gene response in lung and modify subsequent molecular responses? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 51(2), 296-303.
 76. Hoshi K, Mizushima Y, Shiokawa Y, Kageyama T, Honma M, Kashiwazaki S, et al. 1985. Double-blind study with liposteroid in rheumatoid arthritis. *Drugs Exp Clin Res*, 11(9), 621-26.
 77. Hunneyball IM, Crossley MJ, Spowage M. 1986. Pharmacological studies of antigen-induced arthritis in BALB/c mice. I. Characterization of the arthritis and the effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents. *Agents Actions*, 18(3-4), 384-93.
 78. Inman RD. 1991. Infectious etiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 17(4), 859-70.
 79. Ishii KK, Takahashi Y, Kaku M, Sasaki T. 1999. Role of human parvovirus B19 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Jpn J Infect Dis*, 52(5), 201-07.
 80. Ishikawa J, Okada Y, Bird IN, Jasani B, Spragg JH, Yamada T. 2002. Use of anti-

- platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody in the control of disease progression in established collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Jpn J Pharmacol*, 88(3), 332-40.
81. Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O, Toivanen P, Punnonen J. 1999. Synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis are refractory to the T helper type 2 differentiation-inducing effects of interleukin-4. *Immunology*, 96(3), 358-64.
 82. Jin SL, Lan L, Zoudilova M, Conti M. 2005. Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages. *J Immunol*, 175(3), 1523-31.
 83. Kaiser H. 2003. [Cortisone therapy today]. *Wien Klin Wochenschr*, 115(1-2), 6-21.
 84. Kang I, Lee WW, Lee Y. 2000. Modulation of collagen-induced arthritis by IL-4 and dexamethasone: the synergistic effect of IL-4 and dexamethasone on the resolution of CIA. *Immunopharmacology*, 49(3), 317-24.
 85. Kelchtermans H, De Klerck B, Mitera T, Van Balen M, Bullens D, Billiau A, et al. 2005. Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther*, 7(2), R402-15.
 86. Keyszer GM, Heer AH, Gay S. 1994. Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis. *Stem Cells*, 12(1), 75-86.
 87. Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. 1999. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol*, 162(5), 3053-62.
 88. Kirwan JR. 1995. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *N Engl J Med*, 333(3), 142-46.
 89. Kirwan JR, Hallgren R, Mielants H, Wollheim F, Bjorck E, Persson T, et al. 2004. A randomised placebo controlled 12 week trial of budesonide and prednisolone in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 63(6), 688-95.
 90. Kleinau S, Erlandsson H, Holmdahl R, Klareskog L. 1991. Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement. *J Autoimmun*, 4(6), 871-80.
 91. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, et al. 1999. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*, 10(4), 451-61.
 92. Laan RF, Jansen TL, van Riel PL. 1999. Glucocorticosteroids in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 38(1), 6-12.
 93. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201(2), 233-40.
 94. Lim SS, Conn DL. 2001. The use of low-dose prednisone in the management of rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis*, 50(12), 1-4.
 95. Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, Koelsch S, Neudoerfl C, Palm N, et al. 1998. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J Immunol*, 161(9), 4709-18.
 96. Loewi G. 1968. Experimental immune inflammation in the synovial membrane. I. The immunological mechanism. *Immunology*, 15(3), 417-27.
 97. Looney RJ, Hooper M, Pudiak D. 1995. Costimulatory activity of human synovial fibroblasts. *J Rheumatol*, 22(10), 1820-24.
 98. Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. 2005. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther*, 7(1), 29-37.
 99. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. 1999. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*, 286(5445), 1732-35.
 100. Mengozzi M, Fantuzzi G, Faggioni R, Marchant A, Goldman M, Orencole S, et al.

1994. Chlorpromazine specifically inhibits peripheral and brain TNF production, and up-regulates IL-10 production, in mice. *Immunology*, 82(2), 207-10.
101. Menon JN, Bretscher PA. 1998. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. *Eur J Immunol*, 28(12), 4020-28.
 102. Metselaar JM, Wauben MH, Wagenaar-Hilbers JP, Boerman OC, Storm G. 2003. Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. *Arthritis Rheum*, 48(7), 2059-66.
 103. Metselaar JM, van den Berg WB, Holthuysen AE, Wauben MH, Storm G, van Lent PL. 2004. Liposomal targeting of glucocorticoids to synovial lining cells strongly increases therapeutic benefit in collagen type II arthritis. *Ann Rheum Dis*, 63(4), 348-53.
 104. Miller L, Hunt JS. 1998. Regulation of TNF- α production in activated mouse macrophages by progesterone. *J Immunol*, 160(10), 5098-104.
 105. Mocci S, Coffman RL. 1997. The mechanism of in vitro T helper cell type 1 to T helper cell type 2 switching in highly polarized *Leishmania major*-specific T cell populations. *J Immunol*, 158(4), 1559-64.
 106. Moreland LW, Koopman WJ. 1991. Infection as a cause of arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 3(4), 639-49.
 107. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7), 2348-57.
 108. Muller KM, Lisby S, Arrighi JF, Grau GE, Saurat JH, Hauser C. 1994. H-2D haplotype-linked expression and involvement of TNF- α in Th2 cell-mediated tissue inflammation. *J Immunol*, 153(1), 316-24.
 109. Muller M, Baniahmad C, Kaltschmidt C, Renkawitz R. 1991. Multiple domains of the glucocorticoid receptor involved in synergism with the CACCC box factor(s). *Mol Endocrinol*, 5(10), 1498-503.
 110. Muller M, Renkawitz R. 1991. The glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1088(2), 171-82.
 111. Munthe E, Natvig JB. 1972. Immunglobulin classes, subclasses and complexes of IgG rheumatoid factor in rheumatoid plasma cells. *Clin Exp Immunol*, 12(1), 55-70.
 112. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*, 171(11), 6173-77.
 113. Neeck G, Renkawitz R, Eggert M. 2002. Molecular aspects of glucocorticoid hormone action in rheumatoid arthritis. *Cytokines Cell Mol Ther*, 7(2), 61-69.
 114. Nicaise P, Gleizes A, Forestier F, Quero AM, Labarre C. 1993. Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF- α) production by mouse peritoneal macrophages. *Eur Cytokine Netw*, 4(2), 133-38.
 115. Nishimura J, Ikuyama S. 2000. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *J Bone Miner Metab*, 18(6), 350-52.
 116. Nissler K. 1999. Wirkung der Anti-CD4-Therapie im experimentellen Arthritismodell [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena. Med. Fakultät.
 117. Nissler K, Pohlers D, Huckel M, Simon J, Brauer R, Kinne RW. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann Rheum Dis*, 63(11), 1470-77.
 118. Patten C, Bush K, Rioja I, Morgan R, Wooley P, Trill J, et al. 2004. Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease: response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology. *Arthritis Rheum*, 50(10), 3334-45.
 119. Pearson CM. 1956. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 91, 95-101.
 120. Petrow PK, Thoss K, Henzgen S, Katenkamp D, Brauer R. 1996a. Limiting dilution analysis of the frequency of autoreactive lymph node cells isolated from mice with antigen-induced arthritis. *J Autoimmun*, 9(5), 629-35.

121. Petrow PK, Thoss K, Katenkamp D, Brauer R. 1996b. Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Invest*, 25(4), 341-53.
122. Piper JM, Ray WA, Daugherty JR, Griffin MR. 1991. Corticosteroid use and peptic ulcer disease: role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Intern Med*, 114(9), 735-40.
123. Pitzalis C, Pipitone N, Pipitone V, Fioravanti A, Marcolongo R. 2001. [Rheumatoid arthritis. Recent findings and new pathogenic concepts]. *Recenti Prog Med*, 92(3), 217-22.
124. Pohlers D, Nissler K, Frey O, Simon J, Petrow PK, Kinne RW, et al. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol*, 135(3), 409-15.
125. Pohlers D, Siegling A, Buchner E, Schmidt-Weber CB, Palombo-Kinne E, Emmrich F, et al. 2005. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(3), R445-57.
126. Potter M, Wax JS. 1981. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. *J Immunol*, 127(4), 1591-95.
127. Rau R, Wassenberg S, Zeidler H. 2000. Low dose prednisolone therapy (LDPT) retards radiographically detectable destruction in early rheumatoid arthritis--preliminary results of a multicenter, randomized, parallel, double blind study. *Z Rheumatol*, 59 Suppl 2, II/90-6.
128. Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF. 2004. Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol*, 137(1), 65-73.
129. Rohn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, et al. 2006. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 36(11), 2857-67.
130. Saag KG, Koehnke R, Caldwell JR, Brasington R, Burmeister LF, Zimmerman B, et al. 1994. Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. *Am J Med*, 96(2), 115-23.
131. Saag KG. 2001. Resolved: Low-dose glucocorticoids are neither safe nor effective for the long-term treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 45(5), 468-71.
132. Sack U, Kuhn H, Ermann J, Kinne RW, Vogt S, Jungmichel D, et al. 1994. Synovial tissue implants from patients with rheumatoid arthritis cause cartilage destruction in knee joints of SCID.bg mice. *J Rheumatol*, 21(1), 10-16.
133. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3), 1151-64.
134. Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 22, 531-62.
135. Schacht E. 1993. Gegenwärtige und zukünftige Therapiestrategien der rheumatoiden Arthritis (RA). *Z Rheumatol*, 365-82.
136. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. 2002. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*, 96(1), 23-43.
137. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin ASJ. 1995. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, 270(5234), 283-86.
138. Schubert D, Maier B, Morawietz L, Krenn V, Kamradt T. 2004. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol*, 172(7), 4503-09.
139. Simon AK, Seipelt E, Sieper J. 1994. Divergent T-cell cytokine patterns in

- inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(18), 8562-66.
140. Simon J, Surber R, Kleinstaub G, Petrow PK, Henzgen S, Kinne RW, et al. 2001. Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis. *J Autoimmun*, 17(2), 127-36.
 141. Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, Schulze-Koops H. 2005. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther*, 7 Suppl 2, S4-14.
 142. Sommer F, Meixner M, Mannherz M, Ogilvie AL, Rollinghoff M, Lohoff M. 1998. Analysis of cytokine patterns produced by individual CD4+ lymph node cells during experimental murine leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Int Immunol*, 10(12), 1853-61.
 143. Song IH, Gold R, Straub RH, Burmester GR, Buttgereit F. 2005. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate!. *J Rheumatol*, 32(7), 1199-207.
 144. Hart BA, Kraakman E, Jonker M. 1994. An ear swelling reaction for in vivo monitoring of inflammatory T cell activity in collagen-arthritic rats. *J Immunol Methods*, 176(2), 179-84.
 145. Tada Y, Ho A, Koh DR, Mak TW. 1996. Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 156(11), 4520-26.
 146. Takagi T, Tsao PW, Totsuka R, Suzuki T, Murata T, Takata I. 1998. Dexamethasone prevents the decrease of bone mineral density in type II collagen-induced rat arthritis model. *Jpn J Pharmacol*, 78(2), 225-28.
 147. Tamura T, Matsubara M, Hasegawa K, Ohmori K, Karasawa A. 2005. Olopatadine hydrochloride suppresses the rebound phenomenon after discontinuation of treatment with a topical steroid in mice with chronic contact hypersensitivity. *Clin Exp Allergy*, 35(1), 97-103.
 148. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, et al. 1994. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*, 180(6), 2359-64.
 149. Thoss K, Henzgen S, Petrow PK, Katenkamp D, Brauer R. 1996. Immunomodulation of rat antigen-induced arthritis by leflunomide alone and in combination with cyclosporin A. *Inflamm Res*, 45(2), 103-07.
 150. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 146(3), 857-68.
 151. van de Putte LB, Lens JW, van den Berg WB, Kruijsen MW. 1983. Exacerbation of antigen-induced arthritis after challenge with intravenous antigen. *Immunology*, 49(1), 161-67.
 152. van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. 2006. Diversity of regulatory T cells to control arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20(5), 897-913.
 153. Van Wauwe J, Aerts F, Walter H, de Boer M. 1995. Cytokine production by phytohemagglutinin-stimulated human blood cells: effects of corticosteroids, T cell immunosuppressants and phosphodiesterase IV inhibitors. *Inflamm Res*, 44(9), 400-05.
 154. Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Lafeber FP, Bijlsma JW. 1999. The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production. *Ann Rheum Dis*, 58(1), 49-54.
 155. Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Bijlsma JW, Lafeber FP. 2001. Interleukin 10 (IL-10), not IL-4 or interferon-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 28(9), 1960-66.
 156. Visser J, van Boxel-Dezaire A, Methorst D, Brunt T, de Kloet ER, Nagelkerken L. 1998. Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood*, 91(11), 4255-64.
 157. Voulgari PV, Drosos AA. 2006. Adalimumab for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther*, 6(12), 1349-60.
 158. Wagner E. 2005. Einsatz von Glukokortikoiden in der Rheumatologie. *J Miner*

- Stoffwechs, 12(4), 110-15.
159. Weusten BL, Jacobs JW, Bijlsma JW. 1993. Corticosteroid pulse therapy in active rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 23(3), 183-92.
 160. Wollenhaupt J, Zeidler H. 1993. [Early chronic polyarthritis. Possibilities and limits of inhibition of joint destruction]. *Internist (Berl)*, 34(4), 307-15.
 161. Wutzler U. 1998. Therapieeffekte monoklonaler Antikörper gegen T-Zell-Subpopulationen auf die Antigen-induzierte Arthritis der Maus. Dissertation, Medizinische Fakultät der FSU Jena.
 162. Yamaki K, Uchida H, Li X, Yanagisawa R, Takano H, Hayashi H, et al. 2005. Effect of varying types of anti-arthritic drugs on Th1 and Th2 immune responses in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 18(1), 133-44.
 163. Yang YH, Morand EF, Getting SJ, Paul-Clark M, Liu DL, Yona S, et al. 2004. Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 50(3), 976-84.
 164. Yokoyama K, Okamoto H, Watanabe M, Suyama T, Mizushima Y. 1985. Development of a corticosteroid incorporated in lipid microspheres (liposteroid). *Drugs Exp Clin Res*, 11(9), 611-20.

9. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf Bräuer für die Vergabe des Promotionsthemas und die umfangreiche wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Allen derzeitigen und ehemaligen Wissenschaftlern und MTAs der Arbeitsgruppe „Immunpathologie“ danke ich für ihre Unterstützung, für die kritische Diskussion der Daten sowie für die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei W. Kröber, C. Hüttich, H. Börner und U. Griechen für ihre exzellente technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente. Für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente und ELISA-Tests möchte ich Frau Dr. Jutta Simon Dank sagen.

Bei Merckle GmbH und Sigma-Aldrich GmbH möchte ich mich für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Medikamente Lipotalon® und Dexamethason® bedanken.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern Christina und Reinhard Perz, meiner Großeltern Gertrud und Hubert Vieltorf sowie meines Mannes Marcus Wendler wäre die Umsetzung der Promotion kaum möglich gewesen. Bei ihnen möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Rolf Bräuer

Dr. Jutta Simon

Dr. Kirstin Mentzel

Dr. Klaus Thoß

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, am 26.03.2007

Eva-Maria Wendler, Verfasserin

11. Lebenslauf

Eva-Maria Wendler
Lange Brücke 59
99084 Erfurt

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 20.02.1975
Geburtsort: Naumburg/Saale
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Schulausbildung

09/81 - 08/90 Grundschole / Polytechnische Oberschole
09/90 – 06/93 Gymnasium
25.06.1993 Abitur

Studium

10/93 – 03/96 Vorklinisches Studium / Friedrich-Schiller-Universität Jena
13.03.1996 Ärztliche Vorprüfung / Friedrich-Schiller-Universität Jena
04/96 – 04/00 Klinisches Studium / Friedrich-Schiller-Universität Jena
28.08.97 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.03.00 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/00 – 04/01 Praktisches Jahr / Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09.05.2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztin im Praktikum

06/2001 – 12/2002 Ärztin im Praktikum / Abteilung für Pädiatrie und Neonatologie des
Krankenhaus Saale-Unstrut Naumburg

Ärztin in Weiterbildung

seit 03/2003 Ärztin in Weiterbildung für Allgemeinmedizin / Zentrum für Geriatrie Helios
Klinikum Erfurt